

Tesis de Posgrado

Aislamiento, purificación, caracterización y regulación de la proteína transportadora de esteroides sexuales en Bufo arenarum Hensel

Santa Coloma, Tomás Antonio

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Santa Coloma, Tomás Antonio. (1985). Aislamiento, purificación, caracterización y regulación de la proteína transportadora de esteroides sexuales en Bufo arenarum Hensel. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1941_SantaColoma.pdf

Cita tipo Chicago:

Santa Coloma, Tomás Antonio. "Aislamiento, purificación, caracterización y regulación de la proteína transportadora de esteroides sexuales en Bufo arenarum Hensel". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1941_SantaColoma.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**“AISLAMIENTO, PURIFICACION, CARACTERIZACION Y REGULACION
DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES
EN Bufo arenarum Hensel”**

Tomas Antonio Santa Coloma

1985

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"AISLAMIENTO, PURIFICACION, CARACTERIZACION Y REGULACION

DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES

EN Bufo arenarum Hensel"

Autor: Tomás Antonio Santa Coloma

Director: Prof. Dr. Eduardo H. Charreau

Lugar de trabajo

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1985-

R.e

1941
E 2

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Eduardo H. Charreau por su constante apoyo y estímulo durante mi carrera y durante la realización de este trabajo, y por todo lo que aprendí con su ejemplo y con su dedicación al trabajo.

Al Prof. Dr. Marcelo Dankert por orientar mi vocación hacia la carrera de química y por su contribución a mi formación científica.

Al Dr. Jorge A. Blaquier, quien ayudó en mi formación mientras fui estudiante de química.

Al Dr. Hugo M. Garraffo por su colaboración en las síntesis orgánicas y por la interpretación de los espectros de masa y RMN.

Al Dr. J. A. Santomé por la determinación de la composición de aminoácidos.

Al Dr. J.C. Cresto por su colaboración en el aislamiento de los hepatocitos.

Al Dr. Carlos Enrioni, por sus enseñanzas en el aspecto clínico del transporte de las hormonas esteroideas.

A los Dres. Juan C. Calvo y Omar P. Pignataro por la revisión del manuscrito.

A mis compañeros de laboratorio: José L. S. Barañao, Marta Tesone, Ruth G. Ladenheim, Juan C. Calvo, Omar P. Pignataro, Juan P. Radicella, Violeta Chiauuzzi de Santamaría y Ana Rosa de la Cámara de Charreau.

A todos los miembros del Instituto de Biología y Medicina Experimental, y a todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo pudiera realizarse.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
-Hormonas y evolución.	1
DESDE LA SECRECION DEL ESTEROIDE HASTA LA TRADUCCION DEL MENSAJE HORMONAL	
-Secreción de las hormonas esteroides	10
-Interacción del esteroide secretado con las proteínas séricas	16
-Captación de los esteroides	23
-Mecanismo de acción de las hormonas esteroides - efectos genómicos	27
-Mecanismo de acción de las hormonas esteroides - efectos no genómicos	38
PROTEINA TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES	
-Introducción	43
-Secreción y metabolismo	45
-Purificación de la SBP	46
-Características físico químicas de la SBP	50
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y METODOS	
-Métodos generales	55

-Animales	57
-Obtención del suero	57
-Eliminación del esteroide endógeno	58
CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA	
-Determinación de la constante de afinidad (Ka) y de la máxima capacidad de unión (Q) por separación con carbón/dextrano	58
-Cinética de disociación de la DHT unida a la proteína transportadora	60
-Simulación del sistema de separación mediante carbón/dextrano	62
-Electroforesis en estado estacionario	63
-Especificidad de la unión de DHT y estradiol	63
-Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la baSBP	64
-Efecto del pH sobre la estabilidad de la baSBP	64
-Efecto de cationes divalentes y EGTA	65
-Efecto del mercaptoetanol y de NEM	66
-Efecto del peróxido de hidrógeno	67
-Efecto del congelamiento	67
-Determinación del coeficiente de sedimentación	68

-Determinación del radio de Stokes	69
-Determinación del peso molecular, coeficiente friccional, radio equivalente y relación axial/ecuatorial	70
PREPARACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD	
-Adición de un reactivo de Grignard al carbonilo de la androsterona	71
-Técnica de extracción de los productos y análisis de los resultados	73
-Uso de t-butóxido de K como adyuvante	74
-Reacción con una sal de litio	75
-Uso de HMPT como adyuvante	75
-Reacción con una sal de K	75
-Reacción con una sal de K y HMPT	76
-Tetrahidropiranyléter de dihidroepiandrosterona	76
-Síntesis de hemisuccinato de epiandrosterona	76
-Síntesis de hemisuccinato de androstanodiol	77
-Síntesis de diaminodipropilamino- Sepharosa	77
PURIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LA baSBP PURA	

-Precipitación con sulfato de amonio	79
-Electroforesis en geles de poliacrilamida	80
-Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS	80
-Tinción de los geles	80
-Determinación de la absorptividad y espectro de absorción a 205/280 nm	81
-Determinación de la composición de aminoácidos	81

REGULACION Y BIOSINTESIS

-Relación entre el contenido endógeno de estradiol y la máxima capacidad de unión	82
-Efecto del tratamiento con estradiol en animales normales	83
-Efecto de la ovariectomía	83
-Técnica de aislamiento de hepatocitos e incubaciones de células y tejidos	84

RESULTADOS

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA

-Determinación de la constante de afinidad y de la máxima capacidad de unión	85
-Determinación de la constante de velocidad de disociación	89
-Constante de velocidad de asociación	92

-Simulación del sistema de separación con carbón/dextrano	99
-Resultado de las simulaciones	104
-Determinación de la constante de afinidad y de la máxima capacidad de unión mediante electroforesis en estado estacionario	113
-Especificidad de la unión de DHT y estradiol a la baSBP	117
-Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la baSBP	118
-Efecto del pH	118
-Efecto de cationes divalentes y EGTA	121
-Efecto de NEM y 2-mercaptoetanol	126
-Efecto del peróxido de hidrógeno	133
-Efecto del congelamiento	136
-Coeficiente de sedimentación	137
--Radio de Stokes	137
-Peso molecular	142
--Coeficiente friccional, relación axial/ ecuatorial y radio equivalente	142
SINTESIS DE LA COLUMNA DE AFINIDAD	
-Adición de un reactivo de Grignard al carbonilo de la androsterona	143
-Reacción con una sal de litio	145

-Reacción con una sal de K	145
-Síntesis de hemisuccinato de androstanodiol	146
-Acoplamiento a la matriz	147
PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA baSBP PURIFICADA	
-Precipitación con sulfato de amonio	148
-Cromatografía de afinidad	148
-Electroforesis preparativa	159
-Electroforesis en poliacrilamida-SDS	163
-Unión a Concanavalina-A Sepharosa	166
-Espectro de absorción y absortividad a 205/280 nm	169
-Determinación de la composición de aminoácidos	171
REGULACION - INCUBACIONES DE CELULAS Y TEJIDOS	
-Relación entre el contenido endógeno de estradiol y la máxima capacidad de unión	173
-Efecto del tratamiento con estradiol	173
-Efecto de la ovariectomía	176
-Aislamiento de hepatocitos	177
-Incubación de los hepatocitos aislados	181
-Incubaciones con tejido entero	182

DISCUSION	183
BIBLIOGRAFIA	224
APENDICES	235

ABREVIATURAS

TCA	ácido tricloroacético.
IR	infrarrojo.
RMN-H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
EM	espectrometría de masas.
ccd	cromatografía en capa delgada.
uv	ultravioleta.
nm	nanometros.
Ci	Curie.
mmol	milimol.
Ka	constante de equilibrio de asociación.
Kd	constante de equilibrio de disociación.
Q	máxima capacidad de unión.
DHT	dihidrotestosterona.
T	testosterona.
E2	estradiol.
nM	nanomolar.
RIA	radioinmunoensayo.
dpm	desintegraciones por minuto.
ln	logaritmo natural.
log	logaritmo decimal.
^	potenciación.
DES	dietilestilbestrol.
R1881	metiltrienuolona.
EGTA	ácido etilenobis(oxietilenonitrilo) tetraacético.
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético.
Et-SH	2-mercaptoetanol.
NEM	N-etilmaleimida.
[]	concentración.
SBP	Proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG, TeBG, GLAE).
CBG	Transcortina.
Rs	Radio de Stokes.
S	coeficiente de sedimentación.
M	peso molecular.
THF	tetrahidrofurano.
DADA-S	3,3'-diaminodipropilamino-Sepharosa.
SDS	dodecilsulfato de sodio

INTRODUCCION

HORMONAS Y EVOLUCION

Durante el desarrollo de los seres vivos la evolución ha poblado la tierra con un considerable número de especies animales y vegetales que ocupan prácticamente todos los medios. Entre los diferentes tipos del reino animal, algunos están confinados a un único ambiente, mientras que otros, como los Anélidos, Moluscos, Artrópodos y Vertebrados tienen una distribución muy amplia. El grupo de los vertebrados es particularmente ejemplar: los datos paleontológicos han permitido trazar a grandes rasgos la evolución de este grupo, de modo que se puede seguir el desarrollo progresivo de las diferentes formas de vertebrados (agnatos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), en primer lugar en los ambientes acuáticos, después en la conquista de los continentes y por último del espacio aéreo.

Estos acontecimientos estuvieron acompañados de la aparición de órganos nuevos como los pulmones, las alas, etc.. Sin embargo, la evolución de los vertebrados también

ha supuesto cambios de importancia fundamental para la supervivencia de los organismos en lo referente a los mecanismos fisiológicos; por ejemplo, en los mecanismos que regulan el desarrollo y la reproducción, o bien en los intercambios entre los organismos y el medio ambiente. Estas modificaciones precisaron paralelamente del perfeccionamiento del sistema de información que coordina entre sí las diferentes funciones del organismo y le informa de las características y variaciones del medio exterior.

La comunicación intercelular es requerida para la regulación del desarrollo celular y organización en tejidos, para controlar su crecimiento y división, y para coordinar sus diversas actividades. Las células pueden comunicarse entre sí de diferentes formas: en primer lugar, secretando mensajeros químicos que actúan sobre células distantes; en segundo lugar, por medio de moléculas unidas a la membrana plasmática; por último, formando uniones que comunican directamente los citoplasmas o las membranas de las células interactuantes. Asimismo, los mensajeros químicos secretados pueden actuar como mediadores químicos locales (neurotransmisores, prostaglandinas, etc.) los que

son captados y metabolizados rápidamente en las inmediaciones, o pueden ser secretados por células especializadas llamadas endócrinas, liberándose a la sangre para ser transportados hasta las células efectoras. A éstos últimos mensajeros se los denomina Hormonas.

Se comprende así que el sistema nervioso y el sistema endócrino hayan tenido un importante papel en la evolución. Para reconstruir esa evolución no se dispone del mismo tipo de datos que los de la Paleontología, que permiten reconstruir las formas. Hay que limitarse a inferir el pasado a partir de las especies actuales, suponiendo que en general encontraremos los caracteres más primitivos en aquellas especies aparecidas más tempranamente, con todas las incertidumbres ligadas a tal premisa.

En los últimos años la Bioquímica y la Endocrinología han permitido abordar la evolución de las hormonas en el conjunto del mundo vivo, incluidos los seres microscópicos. Se sabe hace mucho tiempo de la existencia en los invertebrados de hormonas específicas, tales como las hormonas de la muda de los insectos (1). Asimismo, hace unos pocos años se ha visto que ciertas hormonas de los

vertebrados (o sustancias semejantes) también están presentes en invertebrados muy diversos, e incluso en organismos unicelulares (protozoos, hongos unicelulares) y bacterias. J. Roth y su grupo demostraron la presencia de insulina en la mosca *Drosophila*, en el gusano de tierra, en protozoos, en hongos microscópicos y en la bacteria *Escherichia coli* (2). Desde 1977 el grupo de M.P. Dubois (3), en colaboración con otros grupos, encontró hormonas de vertebrados (somatostatina, vasopresina, factor liberador de TSH, etc.) en animales muy diferentes, desde las planarias (gusanos planos, muy primitivos) a los insectos. El mismo grupo, junto con T. Marvo (4) y su equipo, encontraron en invertebrados o en organismos unicelulares, hormonas de vertebrados como ACTH, calcitonina, colecistoquinina y otras.

Menos se sabe sobre las hormonas esteroideas en invertebrados y organismos inferiores. El alga acuática *Acryla*, por ejemplo, emplea unas sustancias de estructura similar a esteroideas (antheridiol y oogoniol) como moduladoras de la división sexual (5,6,7,8). El alga *Fusarium* produce zearalenonas que, aunque no son de naturaleza esteroidea, muestran actividad estrogénica en

vertebrados (9,10) y últimamente se ha demostrado la presencia de estradiol en *Saccharomises cerevisiae* (11).

Lo que ocurrió con la evolución de las hormonas en los organismos unicelulares no está del todo claro. Algunos autores han considerado la posibilidad de una transferencia natural de los genes de las hormonas de los vertebrados a las bacterias. Si por el contrario, las hormonas de vertebrados hallados en bacterias forman parte del patrimonio genético de estos microorganismos, se deben revisar los conceptos actuales sobre la evolución de las hormonas. Las bacterias aparecieron hace unos 3.000 millones de años. Si elaboraban ya moléculas tales como la insulina, la ACTH, etc., querría decir que la evolución de estas proteínas ha sido notablemente conservadora (ya que los vertebrados aparecieron hace unos 600 millones de años) y esta conservación sugeriría que las moléculas ancestrales de las hormonas han ejercido importantes funciones en las bacterias. J. Roth (12) opina que dichas sustancias podrían ejercer un papel de comunicación célula a célula. Otra hipótesis formulada por C.N. Hales (13) sostiene que ciertas hormonas proteicas de los vertebrados serían descendientes de enzimas proteolíticas de las bacterias.

Evidentemente aún no hay suficiente información como para tener una idea clara al respecto.

Para la correcta transmisión de la información, la existencia de una especificidad de acción es primordial. Dicha especificidad refleja la presencia, en las células efectoras, de moléculas o conjuntos moleculares (denominados receptores) que reconocen a la hormona, es decir, que se unen a ella con una afinidad muy superior a la manifestada por otras sustancias presentes, incluso semejantes. De hecho, por su estructura, la molécula hormonal lleva un mensaje, pero sólo es realmente una hormona si el mensaje puede ser leído, es decir, si están presentes los receptores adecuados. En las células efectoras, las interacciones hormona-receptor desencadenan una serie de procesos que conducen a los efectos fisiológicos finales. Estos no dependen directamente de la naturaleza de la hormona sino del tipo de diferenciación sufrida por la célula. De esta manera, la evolución de las funciones de las hormonas refleja no sólo la de las moléculas hormonales sino también la evolución de las enzimas que las sintetizan, de las proteínas que las transportan, de los receptores, y además de los eventuales

cambios en el tipo de respuesta en las células efectoras.

Si deseamos precisar la filogenia de las moléculas hormonales y de las demás moléculas relacionadas, debemos primero determinar si son efectivamente homólogas, es decir, si derivan de un mismo antepasado. En el caso de las hormonas de naturaleza proteica y de sus receptores, la evolución de las moléculas hormonales traduce directamente la de los genes. En estas condiciones, cuando los genes derivan unos de otros (por duplicaciones o mutaciones) rigen sobre proteínas cuyas secuencias, aunque diferentes, son similares y reciben el nombre de proteínas homólogas. El grado de homología es menor cuando se consideran proteínas regidas por genes que en la historia de los organismos están más alejados.

La situación es más complicada en el caso de las hormonas no proteicas como las esteroides. Estas hormonas se sintetizan mediante una cadena de reacciones enzimáticas y sobre estas enzimas podrá actuar la evolución modificando la naturaleza de la hormona. Para establecer una homología entre hormonas esteroides será preciso considerar las enzimas implicadas en su síntesis y

demostrar que a su vez son homólogas. Pero, de hecho, las hormonas esteroides han evolucionado muy poco y en su caso apenas tiene importancia el concepto de homología. Sí es importante cuando se considera la evolución de sus receptores y de las proteínas que las transportan cuando dichas proteínas están presentes (14,15).

En éste aspecto es interesante la aparición durante la evolución, principalmente en los vertebrados, de proteínas encargadas del transporte de sustancias poco solubles en el medio intercelular como el colesterol y los esteroides que de él derivan. En el caso de las hormonas esteroides dichas proteínas, además del simple hecho de unir esteroides y transportarlos, podrían tener alguna función en la secreción de los esteroides, en determinar una mayor o menor captación de los mismos según el tejido, o en impedir su captación o metabolización prematura por los tejidos adyacentes a las glándulas que los sintetizan, es decir, tener funciones semejantes a las que poseen las lipoproteínas encargadas del transporte del colesterol. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurre con las lipoproteínas, las hormonas esteroides pueden disociarse rápidamente de sus proteínas transportadoras.

Por este motivo, el estudio de las posibles funciones antes mencionadas se torna particularmente complejo, más aún, cuando tenemos en cuenta que en la mayoría de los vertebrados, además de la proteína específicamente encargada del transporte, existen otras proteínas séricas que aunque tienen menor afinidad por el esteroide, poseen gran capacidad de unión. Por otro lado, en ciertos vertebrados, como roedores y aves, no existen algunas de las proteínas que poseen características de proteínas transportadoras de esteroides (fundamentalmente alta especificidad y afinidad por el esteroide), indicando claramente que, al menos en esas especies, no son necesarias para el mecanismo de transmisión del mensaje hormonal.

Dada la complejidad del sistema, es necesario encontrar un modelo animal que permita construir un primer esquema, simple pero consistente, que haga factible definir la o las funciones de estas proteínas. Por otro lado, es importante que el modelo permita obtener resultados que sean extrapolables al humano y a animales de interés zootécnico. El objetivo fundamental del presente trabajo

es, precisamente, la caracterización de una proteína transportadora de esteroides sexuales hallada en la especie Bufo arenarum, con el fin de determinar si esta especie constituye un modelo apto para el estudio de la función de dicha proteína.

DESDE LA SECRECIÓN DEL ESTEROIDE HASTA LA TRADUCCIÓN DEL MENSAJE HORMONAL

Secreción de las hormonas esteroides:

Una variedad de productos de secreción, incluyendo las hormonas pituitarias (16,17), insulina (18-22), glucagon (22,23), amilasa (24), y catecolaminas (25), son envueltas dentro de vesículas formadas por una bicapa lipídica y secretadas por exocitosis, tal como lo describen Jamieson y Palade (26). Contrariamente, los eventos celulares envueltos en la secreción de las hormonas esteroides no han sido definidos claramente. La hipótesis generalmente aceptada postula que los esteroides, ni bien son sintetizados, alcanzan el espacio extracelular por difusión pasiva (27).

Ultimamente existen evidencias que indican una posible secreción activa de algunas hormonas esteroides, en un proceso relacionado con la exocitosis o idéntico a ella. En este sentido, la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo maduro ha sido el modelo más estudiado. Higuchi y col. (28) demostraron que la secreción de progesterona requiere de calcio y luego de la despolarización de la membrana hay un rápido y significativo incremento en la progesterona secretada. Estos datos indican que probablemente otro mecanismo distinto de una difusión pasiva sea el responsable de la secreción de la progesterona.

Corteel (29) y Gemmell y col. (30,31) han sugerido que la progesterona es captada por gránulos secretorios los que alcanzan el espacio extracelular por exocitosis. Esta afirmación está basada fundamentalmente en la observación de que existe una correlación positiva entre la formación y exocitosis de los gránulos secretorios y el perfil de la secreción de progesterona durante el ciclo estral de la oveja (29,30). Asimismo, Sawyer y col. (32) estudiaron la secreción de progesterona en experimentos "in vitro". Para determinar la correlación entre la formación y exocitosis

de los gránulos secretorios derivados del aparato de Golgi y la secreción de progesterona, incubaron cortes de tejido luteal ovino en presencia de LH o del ionóforo de calcio A23187. El incremento de la secreción de progesterona en respuesta a la LH o al ionóforo fue acompañada de una concomitante exocitosis de los gránulos secretorios. De forma opuesta, en presencia de colchicina, la estimulación de la secreción de progesterona fue significativamente menor, la formación de los gránulos aparentemente bloqueada y se obtuvo muy poca evidencia de exocitosis.

Dado el gran paralelismo entre la exocitosis de los gránulos secretorios y la secreción de progesterona, es probable que la secreción de la misma esté acoplada con la de los gránulos. Aunque el contenido y función de los gránulos es desconocida hasta el momento, los datos obtenidos son compatibles con la existencia de una proteína transportadora de progesterona dentro de los mismos (32). De hecho, en el cuerpo lúteo bovino existen dos proteínas que unen progesterona específicamente (33). Asimismo los sueros ovino y bovino contienen dos proteínas con idénticas propiedades (30,32,34). Si bien estas evidencias no son concluyentes, al menos indican que probablemente la

secreción de la progesterona está mediada por la exocitosis de una proteína transportadora.

La hipótesis de que los esteroides atraviesan la membrana por una simple difusión está sustentada fundamentalmente por el trabajo de Giorgi y Stein (35), quienes demostraron que la captación de los esteroides por las células es independiente de la concentración de los mismos, no es saturable y muestra una fuerte correlación con el coeficiente de partición en n-octanol. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que el ambiente extracelular es mucho más polar que el de la membrana plasmática y en consecuencia los esteroides, de por sí hidrofóbicos presentarán una tendencia a acumularse en la membrana y esta tendencia será mayor cuanto más hidrofóbicos sean (el colesterol es un caso típico). Por otro lado, los esteroides más hidrofílicos, como los corticoides, tendrán dificultades para atravesar el ambiente hidrofóbico de las membranas.

Estas propiedades justifican la necesidad de la existencia de proteínas que al unirse a los esteroides eviten su acumulación en las membranas y faciliten la

secreción o internalización de los mismos, como ocurre con el colesterol. Sin embargo, es posible que en muchos casos no sea necesaria la secreción o internalización de la proteína, bastando con que ésta pueda secuestrar al esteroide de la membrana. En este sentido, Bruot y Collins (36) demostraron que la albúmina de suero bovino aumenta la cantidad basal de progesterona secretada por las células del cuerpo lúteo de rata, como así también la estimulación de la secreción por hormona luteinizante (aunque no descartan un posible efecto indirecto).

Westphal (37) y Eik-Nes (38) demostraron que la secreción de esteroides está aumentada en presencia de proteínas séricas transportadoras. El aumento de la secreción es atribuida a la capacidad de remover los esteroides acumulados en la membrana, permitiendo de esta manera una mayor secreción y un aumento en la síntesis, inhibida por la acumulación del producto (39). Esta hipótesis ha tenido mayor sustento debido a los trabajos de Ewing (40), Davies (41), Condon (42), Bruot (36) y sus respectivos colaboradores. Estos autores demostraron que la albúmina aumenta la fracción de esteroides secretados tanto en tejido luteal como testicular. Asimismo, Condon y

Plate (42) demostraron que el suero libre de esteroides, lipoproteínas y dializado, aumenta en un 20 % la cantidad de progesterona secretada al medio de cultivo, siendo este aumento sólo parcialmente debido a la albúmina. Dichos autores postulan que el aumento adicional obtenido con respecto a la albúmina se debe a la presencia en el suero de proteínas transportadoras de progesterona.

Algunos autores han presentado evidencias de la mediación de proteínas transportadora de corticoides, tanto en la secreción como en la captación de los mismos (43,44). Sibley y col. (45) muestran que la síntesis y secreción de los esteroides adrenales son procesos distintos y separados; diferentes esteroides, aún dentro de un mismo tejido, son secretados por mecanismos diferentes. Probablemente estos mecanismos disímiles se deban a las diferentes características de solubilidad de los esteroides.

En conclusión , existen tres mecanismos postulados para la secreción de las hormonas esteroides:

-difusión pasiva.

-difusión facilitada por proteínas extracelulares con capacidad de secuestrar los esteroides acumulados en las membranas.

-secreción activa, mediada por la exocitosis de proteínas transportadoras específicas.

Interacción del esteroide secretado con las proteínas séricas:

En el año 1913 el farmacólogo Ernst Oppenheimer observó que el efecto tóxico de la digitoxina sobre preparados de corazón de rana era atenuado o eliminado si se agregaba suero a la solución tóxica (46). Oppenheimer supuso que este efecto se debía a la adsorción del esteroide sobre los componentes coloidales del suero y haciendo simples consideraciones cuantitativas concluyó que la unión era fuerte, disociable, e insaturable y que no podía explicarse por una reacción química normal (unión covalente). Además postuló la existencia de un equilibrio entre el esteroide unido a componentes séricos y el unido a las células del corazón. El descubrimiento de Oppenheimer fué el primer ejemplo bien documentado de que la

interacción de un esteroide fisiológicamente activo con proteínas séricas se acompaña de una inhibición de su actividad biológica. Es decir, Oppenheimer reconoció claramente las características fundamentales de lo que hoy conocemos como "interacción esteroide-proteína". Sin embargo, sus observaciones y conclusiones fueron ignoradas por sus contemporáneos.

Las ideas de Oppenheimer estaban de acuerdo con el teorema de Paracelso (1493-1541) el cual afirma que un compuesto es activo únicamente cuando es líquido o está disuelto, porque en estado sólido se encuentra rodeado de muchas moléculas de sí mismo que le impiden manifestar su actividad. De manera equivalente, Oppenheimer postulaba que un compuesto como una hormona es activo cuando se encuentra libre en solución e inactivo cuando está unido a una proteína (equivalente al sólido de Paracelso).

Aproximadamente tres siglos después de haber desarrollado Paracelso sus ideas, Paul Ehrlich (1854-1915) llegó a una conclusión que en principio parece contradecirlas. En obvia referencia a Paracelso, Ehrlich postuló que el requerimiento primordial para la

manifestación de la actividad biológica de una droga, es su fijación o unión a un "receptor" localizado en el tejido efector, para formar un compuesto activo intermediario en el mecanismo de acción. En realidad, el axioma de Paracelso y las ideas de Oppenheimer no se contradicen con el postulado de Ehrlich, sino que más bien se complementan al considerar que el esteroide unido a las proteínas séricas (inactivo) se encuentra en equilibrio con el esteroide libre y éste con el unido al receptor. De estos postulados surgen algunas conclusiones que han sido aceptadas desde hace mucho tiempo como axiomas (47):

- 1-La actividad biológica de una hormona (o droga) es suprimida cuando ésta se une a cualquier proteína sérica.
- 2-La asociación permite el transporte y almacenamiento de una gran cantidad de hormona en forma inactiva, sin efectos desfavorables para el organismo.
- 3-Dado que el complejo se puede disociar instantáneamente, la especie unida es accesible en cualquier instante y por cualquier tejido.
- 4-La asociación protege al esteroide del metabolismo, oxidación o cualquier otro ataque químico.

5-La asociación protege al esteroide de la absorción por el endotelio vascular u otras superficies que puedan competir por los dominios hidrofóbicos o hidrofílicos del esteroide. Esto incluye la captación por los hepatocitos y la filtración glomerular.

Estas conclusiones son insuficientes ya que no explican algunos resultados experimentales y además algunas son francamente contradictorias (como la tercera y la quinta). Veremos entonces algunos conceptos actuales que pueden ayudar a conciliar estos postulados.

Una hipótesis muy generalizada afirma que la fracción de ligando libre en una incubación "in vitro" es equivalente a la fracción libre "in vivo" y constituye el ligando accesible por un tejido efector (por difusión pasiva). Este concepto presupone que la hormona unida no puede disociarse y es tan falso como aquel que afirma que la hormona unida puede disociarse totalmente. En realidad, tal como lo postula Partridge (48), la fracción de ligando accesible por un tejido dado, dependerá fundamentalmente del tiempo de tránsito capilar del complejo ligando-proteína, de la velocidad de disociación del

complejo, de la concentración total del esteroide y de la proteína y de la permeabilidad del ligando frente al endotelio capilar.

El tiempo de tránsito capilar es el tiempo de exposición frente al endotelio capilar y por lo tanto es mucho más corto que el tiempo de tránsito por el órgano entero. El tiempo de tránsito capilar es inversamente proporcional al flujo sanguíneo y es función del volumen y longitud del capilar. Para el cerebro (49) o para el músculo esquelético (50) es de 1 segundo, de 2-3 segundos para los capilares mesentéricos (51) y cercano a 5 segundos en los espacios sinusoidales del hígado (52). En este último caso el valor es muy alto debido a la existencia de grandes poros en los capilares, y en ausencia de una membrana basal el volumen efectivo del capilar se incrementa notablemente por el amplio espacio intercelular existente (espacios de Disse). Asimismo existen zonas de flujo disminuido y estos factores (menor flujo y mayor volumen) contribuyen a incrementar el tiempo de tránsito capilar.

La permeabilidad a la membrana es un factor importante. Si ésta es baja, el esteroide disociado en lugar de difundir, puede simplemente reasociarse. Sin embargo, una alta permeabilidad es necesaria pero no suficiente; otra variable importante es la velocidad de disociación del complejo. Para una proteína determinada, esta velocidad es constante y no depende del órgano en cuestión, como ocurre con el tiempo de tránsito capilar. Si el tiempo de vida media del complejo es mucho menor que el tiempo de tránsito capilar, el tejido tendrá acceso a una fracción de hormona mucho mayor que en caso contrario. En un caso extremo, cuando el tiempo de vida medio sea mucho mayor que el tiempo de tránsito capilar, la fracción accesible "in vivo" coincidirá con la fracción libre "in vitro". Este caso queda ejemplificado en el trabajo de Pardridge y Mietus (53), quienes demostraron esta coincidencia al trabajar con el complejo formado entre la progesterona y un anticuerpo específico.

En vista de las consideraciones anteriores, la fracción de hormona accesible "in vivo" puede ser mucho mayor que la fracción libre "in vitro". No obstante hay que tener en cuenta que los postulados del modelo de

Pardridge se basan en la hipótesis de difusión pasiva del esteroide, es decir, que el esteroide retenido por un tejido es totalmente accesible al mecanismo de traducción de la señal hormonal. En este sentido hay que tener en cuenta algunas consideraciones adicionales. En primer lugar, el esteroide captado por el endotelio capilar debe difundir al espacio intercelular y alcanzar la célula efectora sin ser metabolizado. En dicho espacio podrá existir o no una proteína transportadora y por lo tanto, cuando exista, valdrán las mismas consideraciones hechas anteriormente, pero teniendo en cuenta que el tiempo de tránsito intersticial puede ser mucho mayor que el capilar. Por otro lado es posible que el proceso de transporte transcapilar no sea pasivo sino activo, como ocurre por ejemplo con el transporte de las lipoproteínas (54). En segundo lugar, es importante tener en cuenta el mecanismo de captación de las hormonas esteroides por las células efectoras. Como se verá a continuación, es posible que la premisa del modelo de Pardridge (difusión pasiva) no sea del todo válida, aunque sin duda es más real que la hipótesis de la equivalencia entre el esteroide libre "in vitro" y el accesible "in vivo" o que la hipótesis de que

el esteroide unido puede disociarse totalmente.

Captación de los esteroides :

Como se indicó anteriormente, la hipótesis más generalizada postula que los esteroides, dada su naturaleza liposoluble, entran en las células efectoras por difusión pasiva. Sin embargo, recientes evidencias indican como probable la existencia de transporte mediado (55,56). Una hipótesis de trabajo en este sentido ha sido la siguiente: asumiendo que la asociación del esteroide con el receptor es rápida a 37 °C y no representa una etapa determinante de la velocidad (57), cualquier discrepancia entre la velocidad de asociación al receptor presente en un citosol y la velocidad de asociación a células enteras, podría reflejar una interacción del esteroide con algún componente de la membrana celular. A pesar de las extensivas investigaciones realizadas los resultados no son aún claros. Mientras Milgron y col. (58) en células de útero, Hamilton y col. (59) en células pituitarias y Rao y col. (60) en hepatocitos aislados presentan evidencias en favor de un transporte mediado, Plagemann y Erbe (61) y Giorgi y Stein (35) en células de hepatoma, así como Muller y Wotiz

(62) en células de útero establecen que no hay ningún indicio para suponer un transporte mediado. En particular Giorgi y Stein (35) afirman claramente que la velocidad de entrada de los esteroides a las células es independiente de la concentración de los mismos, no hay competencia por el transporte entre distintos esteroides y la permeabilidad de los esteroides muestra una fuerte correlación entre el coeficiente de partición en n-octanol. Asimismo Ballard (63) postula que en ausencia de evidencias suficientes, es razonable asumir que el transporte ocurre por difusión pasiva.

Por otro lado, un buen indicio en favor de un transporte mediado surgiría de poder demostrar que existe al menos una fracción importante de receptores en la membrana citoplasmática. Algunos autores han trabajado en este sentido. Nenci y col. (64,65), usando un análogo estrogénico fluorescente unido a albúmina, presentaron resultados que indican una localización superficial de los receptores. Esta unión es saturable y competitiva por el estrógeno natural; además los sitios de unión se encuentran únicamente en las células de los tejidos efectoros y poseen una esteroespecificidad muy precisa. Es importante

destacar que estos sitios no muestran una afinidad apreciable por estrógenos sintéticos de estructura no esteroidal o por antiestrógenos no esteroidales en forma similar a lo que ocurre con las proteínas transportadoras. Además, estos autores muestran que existe una redistribución de los sitios de unión dependiente del tiempo y temperatura de incubación ("capping"). Resultados similares se obtuvieron con células de tumores de mama (66) y en ovocitos de *Xenopus laevis* usando técnicas de fotomarcación con sustancias de alta afinidad por los receptores (67).

Nenci y col. (68) sugieren que los sitios de unión localizados en la membrana plasmática pueden ser una fracción de los clásicos receptores o estar constituidos por proteína transportadora de esteroides integrada o absorbida sobre la membrana. En cuanto a las funciones, Nenci afirma que estos sitios podrían actuar como transportadores vectoriales de los estrógenos, como canales iónicos modulables por los esteroides, interaccionando con el sistema de nucleótidos cíclicos o con el citoesqueleto (69,70). Estos sitios podrían actuar también modificando la arquitectura y carga de la superficie celular o actuar

sobre las acciones no genómicas postuladas para los esteroides (71,72).

Resultados similares en cuanto a la localización superficial de los receptores de estrógenos fueron obtenidos por Pietras y Szego (73,74). Estos autores muestran que los hepatocitos unidos a una columna de afinidad, con un derivado de estradiol como ligando, eran eluidos de la misma con el agregado de estradiol pero no con glucocorticoides o andrógenos. Estas células eluidas contenían una cantidad de receptores tres veces mayor que las células no unidas a la columna. Por otro lado, existen algunas evidencias de que la transcortina (43,44) y la proteína transportadora de esteroide sexuales (75) estarían involucradas en la captación del esteroide por las células efectoras.

En conclusión, es posible que el modelo de difusión pasiva, postulado tanto para la secreción como para la captación de los esteroides, no refleje la realidad y hasta tanto no se tengan pruebas concluyentes en contra de un mecanismo activo, éste no debería ser descartado.

Mecanismo de acción de las hormonas esteroides:

1-Efectos genómicos:

Las hormonas esteroides actúan en una gran variedad de tejidos efectores alterando sus estructuras y funciones de muy diversas formas. Sin embargo, se han acumulado muchas evidencias que sugieren un mecanismo similar para estas hormonas, según el cual actuarían modificando la transcripción (76,77).

Los trabajos de Gorski (78), Mueller (79), Hamilton (80) y sus respectivos colaboradores, pioneros en este tema, fueron hechos en el útero de rata estimulado por estrógenos. Estos autores demostraron que la presencia del esteroide produce una estimulación de la síntesis proteica (3) que es precedida por un aumento en los niveles de ARN mensajeros. Estos resultados fueron luego corroborados por distintos investigadores usando tejidos efectores de progesterona (82), glucocorticoides (83), aldosterona (84), dihidrotestosterona (85,86) y vitamina D (87). Posteriormente se demostró que existía un incremento, tanto cualitativo como cuantitativo, en la síntesis de ARN mensajeros que codificaban para proteínas específicamente

inducidas (81,88-90).

Las ideas de Ehrlich sobre la necesidad de un receptor que traduzca el mensaje hormonal no se pudieron aplicar a las hormonas esteroides hasta que Jensen sintetizó el primer esteroide radiactivo de alta actividad específica (91). Con el desarrollo de estas técnicas de marcación, pudo demostrarse la existencia de receptores en distintos tejidos efectores de estrógenos (92), progesterona (93), aldosterona (84), glucocorticoides (94), andrógenos (95), vitamina D (96) y ecdisona (23). Estos receptores se unen a la hormona con alta afinidad y especificidad, encontrándose en cantidades apreciables únicamente en los tejidos efectores.

Los trabajos mencionados y otros posteriores dieron la base para la formulación del mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. Dicho mecanismo postula que la primera etapa es la entrada del esteroide a la célula efectora por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, el esteroide se une al receptor presente en el citoplasma. Luego de formarse el complejo hormona-receptor, éste debe sufrir ciertas modificaciones antes de poder actuar sobre

el núcleo. Este último concepto está basado en observaciones realizadas "in vitro", las que muestran la incapacidad del complejo hormona-receptor para unirse al núcleo a menos que sea manipulado de cierta forma (98). A este proceso por el cual el receptor adquiere la capacidad de unirse al núcleo se lo denomina transformación. Este proceso es distinto del denominado activación, mediante el cual el receptor (apo-receptor) adquiere la capacidad de unirse al esteroide.

Según el mecanismo clásico y generalmente aceptado, una vez que el receptor ha sido transformado, éste puede entrar al núcleo mediante un proceso denominado translocación. Hay que tener presente que el concepto de translocación, que es central en el modelo corriente de acción de los esteroides, está basado en evidencias circunstanciales (92,99-101) y tal como lo puntualiza O'Malley (98), es puramente hipotético. Más aún, el concepto de que el receptor libre tiene localización citoplasmática ha sido cuestionado recientemente.

Los trabajos de Gorski, King y Greene, Notides y Muller (ver revisión en 102) han dado lugar a la necesidad de modificar el mecanismo general de acción de los estrógenos en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, aparentemente el receptor tiene una localización exclusivamente nuclear, esté o no unido al esteroide. Esta hipótesis está basada en los recientes métodos de enucleación que han demostrado que el receptor libre de esteroide se encuentra en la fracción nuclear y no en la citoplasmática y en métodos inmunocitoquímicos que han confirmado los mismos resultados (102). En consecuencia, aparentemente la translocación es un artificio de técnica, es decir, el receptor localizado siempre en el núcleo, aparecería en el citosol al homogeneizar el tejido en ausencia de esteroide, ya que en estas condiciones tendría baja afinidad por los elementos del núcleo.

En segundo lugar, se postula que el receptor se encuentra inmovilizado por interacción con algunos elementos estructurales del núcleo, aunque no tenga unido el esteroide. Este concepto se basa en que la unión del esteroide a tejidos y células intactas o a un receptor fijado a una matriz (hidroxilapatita) no presenta

cooperatividad, mientras que el receptor soluble, en concentraciones fisiológicas, muestra una fuerte cooperatividad (102).

Otros resultados interesantes son los obtenidos por Simmen y col. (103). Ellos demuestran que el estradiol no sólo induce la asociación del receptor a la cromatina, sino que también se asocian simultáneamente la calmodulina y dos proteínas dependientes de calmodulina (una de ellas es la proteinquinasa que fosforila la cadena liviana de la miosina). Por otro lado, Auricchio y col. (104) han presentado evidencias de que la activación del receptor se debe a una fosforilación mediada por una proteinquinasa dependiente de calmodulina. Dado que los estrógenos alteran el contenido de calcio en tejidos efectores (105), es posible que el primer efecto de los esteroides sea un aumento en los niveles citoplasmáticos de calcio, con la consecuente activación de los receptores por una proteinquinasa específica. Evidentemente estos resultados determinarán que próximamente el mecanismo clásico de acción de los esteroides sea profundamente modificado.

Según el modelo clásico, una vez que el complejo hormona-receptor alcanza el núcleo, actúa sobre la cromatina de modo tal que induce una activación de la expresión genética (76,106). Esto ocurriría mediante la unión del complejo a regiones específicas de la cromatina llamadas "sitios aceptores" (107,108). Presumiblemente estos sitios están localizados en las secuencias de ADN cuya transcripción es inducible por la hormona (o cerca de ellas), aunque un segundo sitio con efecto de cascada también es concebible ya que el receptor ha sido encontrado asociado tanto a fracciones transcripcionalmente activas (109) como inactivas (110).

La naturaleza precisa de los sitios aceptores es aún desconocida. El número de sitios de alta afinidad está en el orden de varios miles por núcleo (111,112), pero hay un número mucho mayor de sitios de baja afinidad. El ADN de algún modo está involucrado en la unión dado que Tomking y col (113) demostraron que los sitios aceptores del receptor de glucocorticoides son sensibles a nucleasas específicas de ADN. Aún así, el ADN no sería la única sustancia constituyente de los sitios aceptores, ya que Buller y col. (114) demostraron que para el receptor de progesterona los

sitios aceptores son resistentes a dichas nucleasas.

Las proteínas cromosomales también están relacionadas con la unión, particularmente las proteínas ácidas (107,115). La especificidad de la unión del complejo Progesterona-receptor a cromatina se conserva solamente si las proteínas ácidas de los tejidos efectores están presentes, no importando la fuente de ADN o histonas (108,115).

Por otro lado, Barrack y Coffey (116) han demostrado que la matriz nuclear (constituida fundamentalmente por proteínas ácidas) contiene la mayor proporción (50-90%) del contenido total de receptor nuclear (116,117). La matriz contiene sitios aceptores de alta afinidad, la unión es específica de tejido y necesita una activación previa del receptor en presencia de la hormona (116,118). A pesar de que la matriz nuclear tiene un contenido muy bajo de ADN, estos autores no descartan la posibilidad de una unión al ADN remanente.

Lo que ocurre luego de la unión del complejo a la cromatina es totalmente desconocido. Es posible que exista alguna interacción directa entre el complejo y el ADN, ya

que el receptor transformado es capaz de unirse al ADN "in vitro". Un modelo bastante estudiado en este sentido es el del receptor de progesterona. La subunidad A (119) del receptor tiene algunas propiedades características de una proteína desestabilizante de la doble hélice del ADN: posee una unión preferencial por el ADN de cadena simple y aumenta la susceptibilidad de ADN de cadena doble hacia la nucleasa S1, específica de ADN de cadena simple (120). Uno podría esperar una posible transcripción inducida por la proteína al producir un desenrollamiento en el ADN que permitiese la entrada de la ARN polimerasa en la doble hélice.

Con el desarrollo de las técnicas de clonado molecular es ahora posible estudiar "in vitro" la interacción entre el complejo hormona-receptor y determinados fragmentos de genes, así como también realizar un análisis funcional de los requerimientos secuenciales para la inducción hormonal de la transcripción de los genes clonados, después de ser transferidos a células que contienen los receptores. De esta forma, usando fragmentos clonados del gen de ovalbúmina de gallina, se ha detectado una secuencia característica para la unión de la subunidad A del receptor

de progesterona (121,122). Asimismo, se demostró una unión preferencial del receptor de glucocorticoides a una región específica del ADN del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) (123a,b).

Por otro lado, los estudios funcionales por transferencia de genes clonados a células que responden a un estímulo hormonal, han permitido demostrar que las secuencias de ADN que contienen los sitios de unión son importantes en el control de la transcripción por los glucocorticoides (124-129) y progesterona (18). Hasta ahora no se han hecho estudios similares con estrógenos o andrógenos.

Es importante destacar que a pesar de la mayor afinidad que presenta el receptor por estas secuencias específicas frente al resto del ADN, ésta no es tan alta como debería esperarse para que el receptor pueda distinguirla de los sitios inespecíficos presentes (102). Más aún, las secuencias de muchos de los sitios específicos no son exactamente las mismas. En consecuencia, la unión directa del receptor al ADN, es una hipótesis atrayente, pero los datos no son aún concluyentes. Quizás un complejo

con la matriz nuclear o con otras proteínas nucleares pueda explicar en forma más adecuada el mecanismo de acción de los esteroides.

Otro aspecto de la función de los receptores que no está suficientemente aclarado es la forma en que termina el efecto inducido por el receptor al actuar sobre la cromatina y el destino final de la hormona y del receptor. Además, no se sabe si el receptor actúa en forma catalítica o estequiométrica. Generalmente se acepta que el receptor debe tener unida la hormona para actuar con la cromatina (95,131,132), entonces, la disociación del complejo sería el modo más simple de terminar la señal. Una vez producida la disociación, el receptor podría ser degradado o reciclado hacia el citoplasma.

Las evidencias más sugestivas sobre la existencia de un reciclado fueron dadas por Clark y col (133,134), trabajando con los antiestrógenos nafoxidina, CI-628 y clomifeno. Según estos autores, dichos antiestrógenos actuarían causando una mayor retención de los receptores en el núcleo y previniendo de esta forma una estimulación posterior con estradiol. Asimismo no descartan la

posibilidad de que actúen bloqueando la síntesis del receptor. Sin embargo, las evidencias no son concluyentes y se necesitarán más datos para confirmar un reciclado de los receptores.

Si el receptor no es reciclado, éste deberá ser degradado en el núcleo. Vedeckis y col. (135) tienen evidencias sobre la existencia de una proteasa dependiente de calcio, que posee una fuerte afinidad por el receptor de progesterona. Esta enzima es particularmente abundante en el núcleo, y los fragmentos peptídicos producidos al actuar sobre el receptor no poseen la capacidad de unirse al ADN (136). Otro hallazgo interesante es que los polirribonucleótidos promueven la liberación de los receptores de andrógenos del ADN (137), y por lo tanto, otra posibilidad es que el ARN naciente, inducido por el receptor, sea el encargado de liberar el receptor de la cromatina para ser luego degradado.

Por último, Auricchio y col. (104) encontraron una fosfatasa de localización nuclear y con capacidad de desfosforilar al receptor de estrógenos. Según estos autores dicha fosfatasa sería la encargada de la

terminación de la señal y además, los antiestrógenos actuarían disminuyendo la susceptibilidad del receptor frente a esta enzima.

2-Efectos no genómicos:

La observación de que los esteroides actúan de modo universal a nivel de transcripción ha oscurecido hipótesis previas, en particular, el modelo de interacción esteroide-membrana. Sin embargo, como afirman Thompson y Lippman (138), el ahora clásico mecanismo no es suficiente para explicar todos los efectos conocidos de los esteroides. Baulieu y col. (139), han demostrado que la progesterona y otros esteroides como el estradiol, son capaces de promover la maduración de los ovocitos de *Xenopus laevis*, aunque estas células no tienen los receptores clásicos para esteroides.

El gran sustento al postulado clásico está dado por el hecho de que inhibidores de la biosíntesis de ARN y proteínas bloquean la respuesta fisiológica y también por la demostración de un período de latencia de 20 minutos a varias horas, desde el momento en que el esteroide penetra

a las células hasta que la respuesta hormonal se hace evidente (140). Además, la síntesis de macromoléculas continúa por muchas horas o días aún después de remover todo el esteroide (141). En vista de esto, es posible definir las características que probablemente representan a un efecto no genómico: efecto instantáneo o con un período de latencia muy corto, rápida recuperación después de remover el esteroide e insensibilidad a inhibidores de síntesis de ARN o proteínas.

Existen numerosos efectos descritos que poseen las características mencionadas, entre los que se encuentran: alteraciones de la excitabilidad celular, el potencial de membrana, la actividad contráctil y el contenido de AMP cíclico; modificaciones en el transporte de iones, glucosa y nucleósidos; efectos sobre lisosomas y el transporte electrónico mitocondrial; efectos sobre la actividad de ciertas enzimas (142).

Hay que tener en cuenta que en muchos casos es difícil determinar la importancia fisiológica de los efectos mencionados, particularmente cuando éstos ocurren a nivel de membrana. Dado que las acciones directas de los

esteroides sobre las membranas se encuentran generalmente cuando se usan altas concentraciones de esteroides, en algunos casos varios órdenes de magnitud sobre las fisiológicas, inmediatamente surge la sospecha de que los efectos observados son acciones farmacológicas inespecíficas. Las hormonas esteroides tienen concentraciones séricas entre 1 y 100 nanomolar, estando unidas en mayor o menor proporción a las proteínas transportadoras y en consecuencia la fracción libre es aún menor. Por lo tanto, según las ideas más aceptadas, la captura de los esteroides puede ocurrir sólo si existen en las células efectoras receptores con alta afinidad. Sin embargo, estas afirmaciones deben tomarse con ciertas reservas.

En primer lugar, algunos autores han demostrado que las concentraciones de las hormonas esteroideas en los tejidos pueden ser más altas que en la sangre. Henkins y col. (143) demostraron que la concentración de cortisol en cerebro de gato es por lo menos diez veces más alta que en la sangre. En consecuencia, la concentración sanguínea no refleja adecuadamente la de los tejidos efectores. Por otro lado, en los procesos inflamatorios, los corticoides

se localizan en las áreas afectadas en concentraciones mayores que las encontradas en circulación y en otros tejidos (144). Apparently, este aumento se debe a un incremento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad del tejido más que a un mecanismo de captura específico, pero Amaral y Werthamer (145) demostraron que los linfocitos RPMI-1788, resistentes a cortisol, en presencia de transcortina acumulan el complejo cortisol-transcortina, estando este proceso asociado con una subsecuente inhibición de la síntesis de ADN normalmente inducible por el cortisol. Estos resultados sugieren que la presencia de proteínas con propiedades similares a la transcortina dentro de las células y la captura de la transcortina circulante por las mismas, pueden contribuir a la acumulación del esteroide.

En segundo lugar, en ovarios, testículos, adrenales, placenta, hígado, adipocitos y cerebro, donde los esteroides son sintetizados o metabolizados, las concentraciones de los mismos alcanzan valores que perfectamente permiten una interacción con sitios de baja afinidad (146-148). Asimismo, durante el tratamiento de muchas enfermedades los esteroides suministrados alcanzan

valores de concentración muy altos y lo mismo ocurre en ciertas condiciones patológicas como en la enfermedad de Cushing, en tumores de glándulas endócrinas y aún en condiciones de "stress" o preñez.

Por último, existen numerosos efectos permisivos descriptos para los esteroides (142), los que son rápidos y pueden afectar muchos estímulos hormonales o no hormonales como los debidos a catecolaminas, prostaglandinas, calcitonina, etc. Estos efectos indican que los esteroides pueden actuar en concentraciones para las cuales no tienen efectos por sí mismos, modulando y controlando indirectamente muchas funciones y particularmente actuando a nivel de membrana.

Por lo tanto, a menos que se hayan tenido en cuenta las consideraciones anteriores, no debería afirmarse que las concentraciones usadas en tal o cual experiencia son suprafisiológicas. De todos modos, hasta que no se puedan describir claramente algunos efectos no genómicos, siempre tendremos en duda su importancia fisiológica.

PROTEINA TRANSPORTADORA DE ESTEROIDES SEXUALES

El plasma de la mayoría de los vertebrados estudiados (con excepción de aves y roedores) contiene una proteína transportadora de esteroides sexuales (SBP) (149). Esta proteína presenta mayor afinidad por los andrógenos que por los estrógenos y en algunas especies, como en el conejo (150), tiene afinidad únicamente por los andrógenos. Asimismo, en el humano, la unión con estradiol es importante si la incubación se realiza a 0-4°C, pero a 37°C el estradiol no se une (151) y por lo tanto, en condiciones fisiológicas, la SBP humana uniría solo andrógenos.

La unión de los esteroides a la SBP humana (y de otras especies) es altamente estereoespecífica (152). En general, el esteroide debe poseer un esqueleto esteroideo de 19 carbonos (5-alfa-androstano), aunque algunos nor-esteroides como el 17-beta-estradiol y la 19-nortestosterona también se unen algo en comparación con la testosterona (20-25%). Un requerimiento esencial es la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 17 con orientación beta. Cuando este grupo es acetilado, está presente con orientación alfa (epitestosterona) o

acompañado de sustituyentes en 17-alfa que sean largos o que aumenten la acidez del hidroxilo en 17-beta, la unión se reduce marcadamente o desaparece. Cuando no está presente (p.e. 17-cetoesteroides), no hay unión. Para que exista una alta afinidad por el esteroide, es además necesaria la presencia de una función oxigenada en el anillo A (C-3), presentando mayor afinidad cuando ésta es una cetona que cuando es un alcohol. Por otro lado, la afinidad por los androstenos es menor que la afinidad por los androstanos, siempre que éstos sean 5-alfa-reducidos. No une corticoides, pregnanos ni hormonas sintéticas que no posean las características mencionadas.

La caracterización de la SBP ha sido de interés debido a que la información que se obtenga sobre la estructura molecular puede ayudar a entender el mecanismo por el cual los andrógenos y estrógenos son reconocidos específicamente. Además, por razones evolutivas, las proteínas transportadoras de distintas especies, aunque sean antigénicamente distintas, deben poseer características físico-químicas similares y la información que pueda obtenerse en una especie puede ser útil en las otras y quizás también aplicable a los receptores. Por

otro lado, también ha sido de interés la purificación de la proteína ya que de esta forma es posible marcarla y obtener anticuerpos con el objeto de estudiar su biosíntesis, degradación e interacción con los tejidos efectores.

Secreción y metabolismo:

Los factores que controlan los niveles de SBP en el suero fueron estudiados en su mayoría en el humano. Los estrógenos y las hormonas tiroideas producen un incremento en los niveles séricos, mientras que el exceso de andrógenos o la disminución de las hormonas tiroideas (hipotiroidismo) se correlacionan con una disminución de los niveles (149). Además existe una disminución de la concentración de SBP en la obesidad (153,154) y en el hirsutismo idiopático (155,156), mientras que en la cirrosis se encuentra aumentada (157).

En general se supone que su biosíntesis es hepática aunque no existen aún evidencias suficientes. Recientemente Rosner y col.(158) usando un anticuerpo policlonal encontraron que una línea celular de hepatoma (Hep-G2) puede secretar SBP y que tanto el estradiol como

las hormonas tiroideas la incrementan. Sin embargo, hasta ahora nadie ha presentado resultados similares con hepatocitos de tejido no transformado. Por otro lado, algunos autores (159) creen que la proteína aislada por Rosner no es en realidad SBP y por lo tanto puede ser dudosa la especificidad del anticuerpo utilizado.

Con respecto a su degradación, el único resultado conocido es el obtenido por Suzuki y Sinojara (160), quienes demostraron que la asialo-SBP es captada rápidamente por el hígado.

Purificación de la SBP:

La purificación de la SBP en cantidades suficientes como para poder caracterizarla y obtener anticuerpos se consiguió luego de muchos años de trabajo y perfeccionamiento en las técnicas empleadas. Las principales dificultades se debieron a la gran inestabilidad de la proteína y a la baja concentración existente en el suero que hacía inútiles a las técnicas cromatográficas convencionales. Burstein, en 1969 (161), fue el primero en usar la cromatografía de afinidad en la

purificación de SBP, pero solamente pudo recuperar 0,4% de la actividad sembrada en la columna. Como el mismo Burstein notó, las condiciones de elución no eran las adecuadas ya que destruían la actividad. En el año 1970, Cuatrecasas (162) sugirió que un gel formado por la adición de 3-O-hemisuccinato de 17-beta-estradiol a una matriz de etilendiamino-agarosa podría ser útil para purificar la SBP. Sin embargo esta columna nunca dió los resultados esperados; inexplicablemente la proteína no era retenida por la columna.

En el año 1973 Sica y col. (163) obtuvieron por primera vez una preparación parcialmente purificada del receptor de estradiol usando una columna similar a la propuesta por Cuatrecasas, pero formando el hemisuccinato con el hidroxilo del carbono 17. Dos años después Mickelson y Petra (164), basándose en el trabajo de Sica, pudieron purificar a homogeneidad la SBP humana, aunque el rendimiento obtenido fue solo del 4%. Estos autores determinaron además que el glicerol y el ligando (DHT) estabilizaban a la proteína. En ese mismo año, Rosner y Smith (165) usando una matriz acoplada al esteroide por medio de una unión éster con el hidroxilo del carbono 3 de

la androsterona (posteriormente reducida a diol), pudieron aumentar el rendimiento hasta un 35%. También demostraron que además del glicerol y el ligando, el calcio era importante para mantener la estabilidad de la proteína. Sin embargo, Turner y col. (166) sospechan que la proteína purificada por Rosner contiene una impureza mayoritaria dado que, contrariamente a lo obtenido por todos los autores que han purificado posteriormente a la SBP, la proteína aislada por Rosner no se disocia en subunidades al someterla a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

En el año 1977 Suzuki y col. (167) purificaron SBP bovina usando un derivado de etiniltestosterona, con el objeto de dejar libres las funciones en posición 3 y 17, pero el rendimiento obtenido fue muy pobre (4.8%). Al año siguiente el grupo de Petra (168) pudo finalmente purificar SBP de conejo y humana, con un buen rendimiento (16% y 34% respectivamente). El mayor rendimiento obtenido con la SBP humana, fue atribuido a la menor constante de asociación de la proteína de conejo en comparación con la humana.

Posteriormente, en 1980, Petra y Lewis (169) mejoraron la eficiencia de la columna usando una unión éter (más estable) entre la molécula "puente" y la matriz, en lugar de la unión de tipo iminocarbonato (más lábil) obtenida con la activación por bromuro de cianógeno. Otra modificación importante fue el uso de un derivado en posición 17 con orientación alfa, pero a diferencia del usado por Suzuki, los 5 primeros carbonos de la molécula acoplante estaban reducidos (de alguna manera la mayor acidez del hidroxilo en posición 17-beta, disminuye la afinidad del compuesto usado por Suzuki). Con estas modificaciones consiguieron aumentar la eficiencia de la columna hasta valores del 40-70% para la proteína humana.

Dado que un hidroxilo en posición 17 beta es fundamental para una unión eficiente del esteroide a la SBP, no se comprende claramente por que motivo, contrariamente a lo esperado, los derivados con la posición 17 bloqueada y 3 libre son eficientes, mientras que los derivados con la posición 3 bloqueada y la 17 libre no lo son.

Características físico-químicas de la SBP:

A continuación se describirán algunas características físico-químicas que fueron determinadas en las proteínas transportadoras de esteroides sexuales y que son de utilidad para su caracterización .

Las movilidades electroforéticas de las SBP purificadas de primates y la humana son muy similares, mientras que la aislada de conejo muestra una movilidad mayor (159). A pesar de esto, la composición de aminoácidos es muy similar y posiblemente la diferencia esté dada por el mayor porcentaje de ácido siálico en la proteína de conejo.

El peso molecular obtenido por diversos autores varía según el método utilizado en la determinación (159). Esta variación se debe al alto contenido de hidratos de carbono que posee la SBP (16-30% según las especies), dado que éstos producen anomalías en la determinación de pesos moleculares por filtración en geles, PAGE, y SDS-PAGE.

No existen dudas de que la SBP esta compuesta por subunidades, pero como no se conoce con exactitud el peso molecular, el número de las mismas es incierto. Petra y col. (159) sugieren que la proteína humana está formada por dos subunidades, mientras que Suzuki y col. postulan un número de tres para la bovina (167). Estos autores han realizado la caracterización más completa hasta el momento. La SBP bovina tiene las siguientes características:

Peso molecular -----	89.500
Peso molecular de las subunidades -----	28.400
Número de subunidades -----	3
Coefficiente de sedimentación -----	5,3 S
Radio de Stokes -----	41,8 A
Coefficiente friccional (f/fo) -----	1,42
Volumen específico parcial -----	0,730 ml/gr
Absortividad (1%) a 280 nm -----	10,1
Ab.280/ Ab.260 -----	1,38
Contenido de Hidratos de Carbono -----	17 %
Constante de asociación (testosterona) --	0,11/nM
Sitios de unión por molécula -----	0,8
Punto isoeléctrico -----	4,78

Una característica importante de la SBP es que la unión del esteroide es sensible tanto a reactivos reductores como a reactivos de grupos sulfhidrilos (170). Por ello la proteína no puede ser protegida de la oxidación con el agregado de DTT y dado que además requiere calcio (167), no puede agregarse EGTA o EDTA para protegerla de

cationes divalentes que puedan reaccionar con los sulfhidrilos.

Estos resultados muestran una notable diferencia entre los receptores de andrógenos (estrógenos) y la SBP: contrariamente a lo que ocurre con la SBP, los receptores requieren la presencia de EDTA y DTT en el buffer, para una medición sin pérdida de actividad. Por otro lado, esto refleja una característica común de las proteínas séricas al compararlas con las citoplasmáticas: las proteínas citoplasmáticas se encuentran en un ambiente más reductor (debido a la presencia de glutatión) que las proteínas séricas (debido a la mayor concentración de oxígeno) y por lo tanto cada grupo se encuentra adaptado a su medio natural (171), es decir, los receptores no toleran un medio oxidante y la SBP no tolera un medio reductor. Asimismo, la SBP debe estar adaptada al alto contenido de calcio en la sangre y posiblemente por este motivo lo necesite como estabilizante.

OBJETIVOS

El estudio de la proteína transportadora de esteroides sexuales en el humano presenta diversas dificultades: no es la única proteína sérica con capacidad de transportar esteroides sexuales, se encuentra en bajas concentraciones y fundamentalmente, es muy difícil obtener muestras de tejidos para estudiar su metabolismo y función. Por estos motivos, se hace necesario encontrar un modelo animal que no presente estas dificultades. Idealmente, la especie más adecuada será aquella que tenga altas concentraciones de SBP, que no posea otras proteínas que unan esteroides sexuales y que tenga características físico-químicas similares a la humana.

El principal objetivo de este trabajo es precisamente, determinar si el Bufo arenarum cumple con estas características, es decir, si constituye un modelo apto para el estudio del metabolismo y función de la SBP. Los objetivos parciales que se plantearon son los siguientes:

- Caracterización de la SBP de Bufo arenarum.
- Purificación a homogeneidad.
- Determinación de la existencia de subunidades.
- Composición de aminoácidos.
- Regulación hormonal de su biosíntesis.

MATERIALES Y METODOS

METODOS GENERALES

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se realizaron utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 421, dispersando la muestra con Nujol. Los espectros de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (RMN-H) se efectuaron a 100 MHz con un espectrofotómetro Varian XL-100-15, utilizando cloroformo deuterado como solvente y tetrametilsilano como señal de referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan como $\delta =$ ppm. Los espectros de masa (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro computarizado Varian-MAT CH7-A. En todos los casos las muestras fueron introducidas directamente en el equipo.

Las mediciones de radiactividad (Tritio) se llevaron a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS-100C. La solución centellante contenía 4,0 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0,25 g de dimetil-POPOP por litro de solución de tolueno y 10% de dioxano.

Las cromatografías en placa delgada (ccd) analíticas se realizaron en placas de sílica gel 60 F254 sobre aluminio (Merck) usando como reveladores vapores de Iodo, una solución acuosa de ácido sulfúrico al 50% con posterior calentamiento a 100 °C, o luz uv (254 nm). Las ccd preparativas (0,25 mm de espesor) se efectuaron utilizando sílica gel 60 F254 (Merck), observándolas luego de desarrolladas a la luz uv (254 nm). Para las ccd se usó cloruro de metileno (con proporciones variable de metanol, 5-10%) como solvente de desarrollo.

Las ultracentrifugaciones se realizaron en una centrifuga Beckman L5-50 con un rotor SW-56 y las incubaciones en un incubador modelo Dubnoff. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry (172) o medición a 280 y/o 205 nm (173). El material radiactivo fue comprado a New England Nuclear ([1,2-³H]dihidrotestosterona, 40 Ci/mmol; [1,2-³H]-testosterona, 52 Ci/mmol; [2,4,6,7-³H]estradiol, 113 Ci/mmol). Los esteroides no radiactivos a Steraloids. El resto de los reactivos fue de grado analítico.

Animales:

Se utilizaron hembras adultas de la especie Bufo arenarum Hensel con un peso promedio de 150 g. Los animales fueron capturados durante los meses de septiembre a marzo y colocados en un ambiente con temperatura controlada y agua a su alcance. Además fueron alimentados (por medio de una jeringa de grueso calibre) 2 veces por semana con alimento balanceado. Algunas determinaciones se realizaron en machos adultos del mismo peso.

Obtención del suero:

La sangre fue obtenida por decapitación y dejada en reposo durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego de la coagulación se centrifugó a 1000 g 10', obteniéndose aproximadamente 4 ml de suero por animal. El suero obtenido se usó inmediatamente o en algunos casos fue congelado a 20 °C hasta su uso.

Eliminación del esteroide endógeno:

A menos que se indique lo contrario, antes de los distintos ensayos el suero se trató con 1,2% (p/v) de carbón, durante 2 horas a 25 °C y con agitación intermitente cada 15'. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 2.000 g 10' y luego a 10.000 g 15'.

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA

Determinación de la constante de afinidad (Ka) y de la máxima capacidad de unión (Q) por separación con carbón/dextrano:

Como primer ensayo se utilizó el método descrito por Belgorosky y Rivarola (174) para la determinación de la constante de afinidad (Ka) y de la máxima capacidad de unión (Q) de la SBP humana. Se incubaron distintas cantidades de suero (2,5,10,15,20 y 30 μ l) con 20.000 dpm de ³H-DHT en 0,5 ml de buffer A (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, gelatina 0,1%, pH 7,4) y con concentraciones crecientes de DHT no marcada (1,2,4,8,16,32 y 500 nM). Luego de 15' de incubación a 25 °C y de 15' a 4 °C se agregaron 0,25 ml de

una suspensión de carbón (carbón 1,2% / dextrano 0,12%), se agitaron los tubos y a los 5' se centrifugaron a 2.000 g 10'. Una alícuota de 0,5 ml de cada fracción fue contada y se calculó el % de hormona unida en cada fracción.

Como los resultados no dieron una curva de desplazamiento coherente, se buscaron las condiciones óptimas para el ensayo en el Bufo arenarum. Para ello se modificó la temperatura y tiempo de incubación, la concentración de carbón, el volumen de suero y el rango de concentración del esteroide. Finalmente, el ensayo para testosterona, DHT y estradiol se realizó de la siguiente forma: luego de eliminar el esteroide endógeno, se incubaron 20 ul de suero con 20.000 dpm de hormona en 0,5 ml de buffer A y con 1,5,10,15,20,40,60,80,100,200, y 300 ng de hormona fría. Todas las incubaciones se hicieron por duplicado y además se determinó el valor de un blanco incubado en las mismas condiciones pero sin el agregado de suero.

Las muestras fueron incubadas durante 2 hs a 25°C y después de agregar 25 ml de la suspensión de carbón modificada (0,4% de carbón / 0,04% de dextrano) y de agitar

2 veces (aprox. 5'), se centrifugaron a 2.000 g 10'. Al finalizar la centrifugación se contaron alícuotas de 0,5 ml y descontándose el valor del blanco a cada tubo, se analizaron los resultados mediante un programa escrito en BASIC (175), diseñado para descomponer el gráfico curvilíneo en dos componentes según el método de Rodbard (176).

Cinética de disociación de la DHT unida a la proteína transportadora:

La medición de la constante de velocidad de disociación se realizó en primer lugar de la siguiente forma: se incubaron en diversos tubos y por duplicado 20 μ l de suero con 20.000 dpm de ³H-DHT disueltas en buffer A, en un volumen final de 50 μ l. Luego de dos horas de incubación se agregaron 0,45 ml del mismo buffer (con o sin DHT fría, 1 μ g/ml) y 0,25 ml de la suspensión de carbón/dextrano a distintos tiempos. Los resultados se indicaron como % de DHT unida vs tiempo (minutos).

Posteriormente se modificó el método de separación, realizando una filtración rápida de la mezcla con carbón en lugar de centrifugarla. De este modo pudieron obtenerse mediciones en tiempos muy cortos que permitieron determinar la constante de disociación. En primer lugar se usaron filtros Millipore (0,45 μm) pero la mayor parte del esteroide quedaba adsorbido sobre los mismos. Se usaron entonces filtros de fibra de vidrio (Reeve Angel, 934AH) con buenos resultados y además se usó una cantidad de suero 20 veces menor, es decir 2 $\mu\text{l/ml}$ de incubación. La concentración de $^3\text{H-DHT}$ fue la misma y el volumen final de incubación fue de 0,5 ml. Se dejó llegar al equilibrio incubando durante 1 hora a 25°C.

Para evitar la reasociación durante la disociación se usaron dos métodos distintos. En el primer método se agregó un exceso de carbón/dextrano (0,25 ml de una mezcla de carbón 1 %/dextrano 0,1%, sobre 0,5 ml de incubación) y se determinó la radiactividad unida a distintos tiempos. En el segundo método, a 0,25 ml de una solución de $^3\text{H-DHT/SBP}$ doblemente concentrada se le agregaron 0,25 ml de una solución de hormona fría con una concentración final 10 veces la necesaria para saturar la proteína (600 ng/ml).

De este modo, la concentración final de SBP fue la misma que en el caso anterior. A distintos tiempos se agregaron 0,25 ml de la mezcla de carbón dextrano (3% carbón / 0,3% dextrano) y luego de 10 segundos los tubos fueron filtrados por vacío, operación realizada en aproximadamente 1 segundo por tubo.

Finalmente se contaron alícuotas de las muestras y los resultados se graficaron como \ln (dpm unidas) vs tiempo en segundos. De la recta obtenida por cuadrados mínimos se determinó la constante de velocidad de disociación y el error mediante el uso de los coeficientes de Gauss y el error típico de la estimación (177).

Simulación del sistema de separación mediante carbón dextrano:

Como la cinética de disociación resultó muy rápida, era necesario determinar en qué forma podía afectar el método de separación con carbón a los resultados obtenidos mediante los gráficos de Scatchard. Para esto se diseñó un programa capaz de simular el sistema. El modelo matemático se explica junto con los resultados y los programas

escritos en BASIC se encuentran en los apéndices. Para la simulación se usó una computadora HP 86A de 128 K.

Electroforesis en estado estacionario:

Para confirmar los resultados obtenidos mediante las simulaciones se determinó la constante de afinidad y la capacidad de unión mediante electroforesis en estado estacionario según el método de Ritzen (178). Como no pudieron obtenerse buenos resultados con este método, se realizó la separación del esteroide libre y del unido a la proteína por electroforesis. Este método se explica junto con los resultados.

Especificidad de la unión de DHT y estradiol a la SBP:

La especificidad de la unión de DHT y estradiol a la SBP se determinó mediante ensayos de desplazamiento, usando 20 μ l de suero en 0,5 ml de buffer A a 25 °C con 1 nM de ³H-DHT o ³H-estradiol y un exceso de 1.000 veces de cortisol, progesterona, dietilestilbestrol (DES), estradiol, etinilestradiol, nafoxidina, metiltrienolona (R1881), DHT, testosterona y estradiol, todos sin marcar. Las cantidad

de DHT y estradiol unida en ausencia de competidor se consideró como 100% de unión.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la SBP:

Se incubaron 20 μ l de suero durante dos horas a distintas temperaturas, en un buffer fosfato 50 mM, pH 7,4 con una concentración 400 nM de H-DHT³. El volumen final fue de 0,5 ml. Luego se realizó una segunda incubación a 4 °C durante dos horas y finalmente se agregaron 0,25 ml de la mezcla de carbón, se centrifugó a 2.000 g 10' y se contaron alícuotas de 0,3 ml. Los resultados se expresaron como % de DHT unida vs temperatura.

Efecto del pH en la estabilidad de la SBP:

Se incubaron 20 μ l de suero con 20.000 dpm de H-DHT durante dos horas en buffer citrato 50 mM, fosfato 50 mM a distintos valores de pH (3-11) y a 4°C en un volumen final de 0,5 ml (por duplicado). Otra serie de tubos se incubó en las mismas condiciones pero en presencia de 400 nM de DHT fría. Para ver la reversibilidad del efecto del pH, luego de la incubación se tomó 1/3 del volumen de cada

tubo, se ajustó el pH a 7,4 y se incubó durante dos horas más. Las muestras fueron procesadas como ya se mencionó.

Por otro lado, se colocó 1/3 del volumen total de la muestra de mayor concentración (400 nM) a -20 °C durante 7 días para determinar el pH óptimo de almacenamiento. A los 7 días se incubaron las muestras por dos horas a 25 °C, pH 7,4 y se procesaron como se indicó anteriormente. Los resultados se expresaron como % de DHT unida vs pH.

Efecto de cationes divalentes y EGTA en la unión de DHT:

Se incubaron 20 µl de suero con 20.000 dpm de ³H-DHT en 0,5 ml de buffer A durante 2 hs a 25 °C y en presencia de cloruro de Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, y Hg²⁺ en distintos tubos y a una concentración de 50 mM. Luego de la incubación se procesaron los tubos como se indicó anteriormente. Se tomó el valor del control (sin el agregado de ningún catión) como 100% de DHT unida. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado.

Asimismo, el suero fue mantenido a 4 °C durante 7 días (iguales condiciones de incubación) en presencia o no de EGTA (10 mM) para determinar la estabilidad de la proteína

en ausencia de Ca^{2+} . Otra serie de tubos se incubó durante 6 días y luego 1 día más en presencia de cloruro de calcio (50 mM). Una incubación similar se realizó durante un período de dos horas. Los tubos se trataron como se indicó anteriormente y la actividad del control se tomó como 100%.

Efecto del 2-mercaptoetanol (Et-SH) y de la N-etilmaleimida (NEM) sobre la unión de DHT:

El suero fue incubado en las condiciones antes indicadas pero en presencia de concentraciones crecientes de 2-mercaptoetanol (0-1M) y de N-etilmaleimida (0-0,1 M). Las muestras se procesaron como ya se indicó y los resultados se expresaron como % de DHT unida (dpm) vs log [reactivo]. Asimismo, se realizaron incubaciones en las mismas condiciones indicadas en el ensayo para la determinación del número de sitios de unión y de la constante de afinidad, pero luego de incubar durante dos horas, se agregó mercaptoetanol (50 mM) o NEM (12,5 mM) y se incubó durante dos horas más. Los resultados se analizaron de la misma forma (dos componentes).

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la unión de DHT a la SBP:

Para estudiar el efecto de un oxidante sobre la unión de DHT a la SBP, el suero se incubó en condiciones similares a las anteriores pero en presencia de cantidades crecientes de peróxido de hidrógeno (0-100 mM). Las muestras fueron procesadas como va se indicó y los resultados expresados como DHT unida (dpm) vs log [oxidante]. Por otro lado, se estudiaron los efectos del Ca^{2+} (10 mM) y del EGTA (10 mM) sobre la oxidación en las condiciones anteriormente indicadas.

Efecto del congelamiento:

Se colocaron 20 μl de suero en 0,5 ml de buffer A con 20.000 dpm de ^3H -DHT, en presencia DHT fría (400 nM) o glicerol (10%). Las muestras (por duplicado) fueron congeladas 5 veces a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora cada vez y luego incubadas durante 2 horas a $25\text{ }^\circ\text{C}$ con una concentración final 400 nM de DHT. Luego de la incubación las muestras se procesaron como se indicó anteriormente.

Determinación del coeficiente de sedimentación:

El coeficiente de sedimentación de la SBP fue determinado en un gradiente de sacarosa (5-20%, en buffer Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4 a 25 °C). Se sembraron 0,2 ml de suero y se centrifugó durante 16 hs a 105.000 g (4 °C). Se usó como referencia interna citocromo c (equino) y en otros tubos citocromo c (equino), IgG y albúmina humanas, para construir la curva patrón (todos los tubos por duplicado). Terminada la corrida cada gradiente fue dividido en 30 fracciones y en cada fracción se midió la absorbancia a 280 nm para localizar las proteínas de referencia y a 412 nm para el citocromo c (éste fue usado para constatar la reproducibilidad de los gradientes).

Posteriormente las fracciones correspondientes al suero fueron incubadas con 20.000 dpm de ³H-DHT, tratadas con carbón y contadas como se describió anteriormente. En tubos paralelos se agregó DHT fría en exceso (4 µM) para determinar la unión específica por diferencia. Luego de las mediciones se graficó la distancia desde el menisco vs el coeficiente de sedimentación (a 20 °C y en agua) para los patrones. El coeficiente de sedimentación se determinó

por interpolación en la recta obtenida por cuadrados mínimos. La determinación se realizó dos veces.

Determinación del radio de Stokes:

El radio de Stokes fue determinado por filtración molecular. Se usó una columna de Ultrogel AcA 44 (tiene mejores propiedades mecánicas que el Sephadex) de 0,6 x 80 cm y con un flujo de 10 ml por hora a 4 °C. El buffer fue el mismo usado en la determinación del coeficiente de sedimentación. Para la determinación del volumen muerto se usaron 2 mg de Azul-dextrano y para el volumen total mediciones geométricas. Como patrones para la curva de calibración se usaron 3 mg de los mismos patrones usados para el coeficiente de sedimentación. Se sembraron 0,1 ml de suero, se recolectaron fracciones de 1 ml y se determinó el volumen de elución de cada fracción por lectura a 280 y 412 nm. La SBP fue localizada como se indicó en la determinación del coeficiente de sedimentación.

Graficando K_{av} vs \ln [radio de Stokes (nm)] (179) se obtuvo la curva patrón y por interpolación se determinó el radio de Stokes de la SBP. Tanto en la determinación del

coeficiente de sedimentación como en la del radio de Stokes el error interensayo fue menor que el intraensayo y en consecuencia es este último el que se consideró.

Determinación del peso molecular, coeficiente friccional, radio de una esfera equivalente y relación axial ecuatorial:

Los valores del radio de Stokes (R_s) y del coeficiente de sedimentación (S) de la SBP se usaron para determinar su peso molecular. El peso molecular M y el coeficiente friccional (f/f_0) se calcularon según las ecuaciones siguientes (180, 181, 182):

$$M = (6 \pi \eta N R_s S) / (1 - \bar{v} d)$$

(considerando $\bar{v} = 0,725$ ml/gr).

$$f/f_0 = R_s / (3 M \bar{v} / 4 \pi N)^{1/3}$$

(considerando a la proteína deshidratada).

η = viscosidad del agua a 20 °C.

N = número de Avogadro.

\bar{v} = volumen específico parcial.

d = densidad del agua a 20 °C

Con el valor de f/f_0 se calculó la relación axial ecuatorial (considerando a la proteína deshidratada) en base a la ecuación de Perrin (183) para prolatos que fue

resuelta mediante un programa iterativo diseñado en BASIC para una computadora HP-86.

PREPARACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD

Dado que la constante de afinidad obtenida con la SBP de Bufo arenarum fue dos órdenes menor que la humana, se intentó sintetizar una columna que dejase libres en el esteroide los dos grupos más importantes para la unión. A continuación se describen todos los métodos usados con este fin y la síntesis finalmente elegida.

Adición de un reactivo de Grignard al carbonilo en posición 17 de la androsterona:

El método está basado en la adición de $\text{ClMg}(\text{CH}_2)_6\text{-OMgCl}$ a androsterona, siguiendo la técnica de Cahiez y col. (184) para un compuesto similar. En primer lugar, se sintetizó cloruro de isopropilo: en un balón de 500 ml se agregaron 1 mmol de Cl_2Zn anhidro y 80 ml de HCl concentrado (2,6 moles). Se colocó el balón en un baño a $0-4^\circ\text{C}$, se armó un equipo de destilación (sin columna de fraccionamiento) y se enfrió el balón que recibiría al

destilado con una mezcla de Cl_2 y hielo (aprox. -10°C). A continuación, fueron agregados 390 mmoles de isopropanol y subiendo la temperatura a 40°C se dejó reaccionar durante una hora con agitación continua. Durante este tiempo se fue recogiendo el destilado (aproximadamente 35 ml) y se guardó en el congelador sobre sulfato de Mg anhidro.

El paso siguiente fue la síntesis de cloruro de isopropil magnesio: se colocaron en un balón 30 mmoles de Mg con 20 ml de tetrahidrofurano (THF) y 30 mmoles de cloruro de isopropilo. La reacción se matuvo a reflujo durante 4 hs en atmósfera de nitrógeno. Todos los pasos fueron realizados en condiciones estrictamente anhidras. Además se agregaron algunos cristales de iodo y 0,6 mmoles de $\text{Br}_2(\text{CH}_2)_2$ como iniciadores de la reacción, cada hora.

Terminada la reacción se sintetizó el compuesto de adición: a 30 mmoles de 6-Cl-hexanol disueltos en 30 ml de THF se agregaron 30 mmoles del cloruro de isopropilo previamente sintetizado. Luego de 20' a 20°C , se agregaron 40 mmoles de Mg y se dejó a reflujo durante 4 hs con agitación y agregando cada hora 0,18 ml de $\text{Br}_2(\text{CH}_2)_2$.

Finalmente se agregaron 1,5 mmoles de androsterona disueltos en THF y se dejó durante 2 hs a reflujo. Terminada la reacción se agregaron lentamente 30 ml de HCl 4 N y después de la desaparición del exceso de Mg, se evaporó el THF bajo vacío en un baño a 70 °C.

Técnica de extracción de los productos y análisis de los resultados:

Se extrajo con cloruro de metileno (20 ml) 3 veces, se lavó con agua hasta eliminar el ácido y se secó con sulfato de Mg anhidro. A continuación se tomó una alícuota y se efectuó una cromatografía en placa delgada (cloruro de metileno con 5% de metanol) y se reveló con ácido sulfúrico. Como las reacciones secundarias de la adición de un reactivo de Grignard a un carbonilo son la reducción y la enolización se agregaron como referencias el producto de partida (por la enolización) y el diol correspondiente a la reducción en 17 (beta) de la androsterona.

Luego del revelado se realizó una cromatografía preparativa de las bandas obtenidas (relación 1:300 y con 10% de metanol) y se aislaron los productos revelándolos

con luz uv y extrayéndolos 3 veces con cloruro de metileno que contenía 20% de metanol, en caliente. Posteriormente se realizó un espectro IR a cada una de las manchas y un espectro de masas a la más polar. Este último compuesto fue oxidado posteriormente con el reactivo de Jones (0-4 °C) y se siguió nuevamente la técnica descrita para la purificación y análisis del producto. (extracción, cromatografía en placa delgada, cromatografía preparativa, y espectro de masas).

Uso de ter-butóxido de K (t-BOK) como adyuvante:

Con el fin de obtener un mayor rendimiento en la reacción anterior se ensayó el uso de t-BOK como adyuvante, ya que estaba descrito que el mismo favorecía la adición frente a la reducción y la enolización en reacciones de adición similares (185). La reacción, extracción, purificación y análisis del producto se llevó a cabo como se indicó anteriormente, pero agregando 130 mg de t-BOK luego de sintetizar el reactivo de Grignard.

Reacción con una sal de litio:

Con el fin de aumentar la reactividad del compuesto organometálico se sintetizó una sal de Li en lugar de la sal de Mg usándose como reactivo un alquino (5-hexin-1-ol): a 2,5 mmoles de butil-Li disueltos en 8 ml de THF se agregaron 1 mmol de 5-hexin-1-ol y luego de su disolución total 0,3 mmoles de androsterona, dejándola reaccionar 20 hs a 20 °C. Se procedió luego a la extracción y análisis como se explicó anteriormente.

Uso de Hexametilfósforotriamida (HMPT) como adyuvante:

Se realizó la reacción como antes pero con el agregado de 2 ml de HMPT previamente secada sobre Na y destilada como adyuvante (185). La extracción de los productos y análisis se realizó como ya se indicó.

Reacción con una sal de K:

Se siguió el método descrito por Musto y col. (186). Luego de terminada la reacción de adición al carbonilo de la androsterona, se siguió la técnica de extracción y análisis antes descripta.

Reacción con una sal de K y HMPT:

Se repitió la reacción anterior con el agregado de HMPT y se procedió de la misma forma.

Tetrahidropiranyléter de dehidroepiandrosterona (DHA):

Siguiendo el método de Greenhalga y col.(187) se colocaron 2,5 mmoles de DHA en un balón con 6 ml de dihidropirano y se agregaron 3 gotas de POCl_3 manteniendo el balón en un baño de agua a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 90'. Luego se colocó el líquido sobre 20 ml de solución saturada de bicarbonato de Na y se aisló y analizó el producto como se describió anteriormente. El rendimiento fue mayor del 90%. Después se lo usó como reactivo con el método antes descrito para la sal de K.

Síntesis de hemisuccinato de epiandrosterona:

Tres mmoles de epiandrosterona fueron colocados en un balón junto con 26 mmoles de anhídrido succínico y 10 ml de piridina. Se calentó a reflujo durante 15' con agitación y luego una hora a 100 °C. Al finalizar la reacción se

agregaron 30 ml de HCl 6 N y se procedió a la extracción como se indicó anteriormente. El producto fue recristalizado con metanol hasta homogeneidad cromatográfica (2 veces) y finalmente fue analizado por RMN.

Síntesis de hemisuccinato de androstanodiol:

El producto antes sintetizado (2,8 mmoles) fue colocado en un balón junto con 28 mmoles de borohidruro de Na, 30 ml de THF y 7 ml de agua. Se calentó a 60 °C durante una hora. Luego de acidificar con ácido acético hasta pH 3 se extrajo el producto y se lo purificó por cromatografía preparativa y posterior recristalización hasta homogeneidad cromatográfica. El producto, 3β -hemisuccinato de 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol, fue analizado por RMN.

Síntesis de diaminodipropilamino-sepharosa:

La síntesis de 3,3'-diamino-dipropilamino-sepharosa (DADA-S) se realizó según la técnica descrita por Mickelson y Petra (188), utilizando sepharosa activada con

bromuro de cianógeno según la técnica de March y col (189).

El acoplamiento del esteroide a la columna fue realizado usando el método con carbodiimida descrito por Parikh y col.(190) pero con dioxano en lugar de dimetilformamida ya que el esteroide no era soluble en ella. Se equilibraron 2 ml de DADA-S con dioxano diluido con agua (70+30 de agua) y se empacaron en una columna. Después se agregaron 0,1 mmoles de hemisuccinato de androstanodiol disueltos en el mismo solvente y 3 mmoles de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.HCl disueltos en la menor cantidad de agua posible. La mezcla de reacción se recicló durante 15 hs por la columna. Luego se lavó con 60 ml de dioxano diluido, 30 ml de etanol 80% en agua, 20 ml de agua y finalmente con 40 ml de buffer de elución. Cuando se comprobó que la columna era efectiva para la purificación se repitió el procedimiento pero con una cantidad de reactivos 10 veces mayor.

PURIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LA SBF PURA:

Precipitación con sulfato de amonio:

Se eligió como primera etapa de purificación de la SBF una precipitación del suero con sulfato de amonio. En primer lugar se determinó la concentración óptima de sulfato de amonio. El suero (30 ml) fue diluido con buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 50 mM, glicerol 10% y pH 7,4 a 25 °C) hasta una concentración aproximada de 2 gr/l. Se agregó entonces una solución saturada de sulfato de amonio (a 4 °C y neutralizada con amoníaco) hasta obtener una saturación del 25 al 60% en fracciones de 1 ml y por duplicado. El agregado se realizó gota a gota y con agitación, manteniendo la temperatura entre 0 y 4 °C. Al finalizar el agregado, se continuó agitando durante dos horas y se centrifugó a 16.000 g durante 30'. El precipitado se resuspendió en el mismo buffer llevándolo al volumen original y el sobrenadante fue descartado. La unión de la DHT a cada fracción se determinó con el método de carbón antes descrito usando una concentración de hormona saturante para el sitio de mayor afinidad.

El resto de la metodología utilizada en la purificación (reciclado de la columna, cromatografía preparativa, etc.) se explica junto con los resultados obtenidos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Las electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y con fines analíticos se realizaron según el método de Ornstein y Davis (191a,191b)

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS:

Con el fin de determinar el peso molecular, la presencia de subunidades y confirmar la pureza de la proteína, se realizaron electroforesis en geles conteniendo SDS mediante el método de Laemmli (192) y el de Weber y Osborn (193).

Tinción de los geles:

Las tinciones se realizaron con tres métodos distintos según se indique: Coomassie Brilliant Blue R-250 (194), Reactivo de Bradford (195) o tinción con Ag (196).

Determinación de la absorptividad molar y del espectro de absorción:

Con el objeto de poder cuantificar la proteína pura mediante un método no destructivo y de obtener un dato útil en la caracterización de la SBP, se determinó la absorptividad a 205 nm (173). Además, se realizó un barrido para obtener el espectro entre 190 y 300 nm.

Determinación de la composición de aminoácidos:

Para el análisis de la composición de aminoácidos se hidrolizó una muestra de SBP (50 µg) en HCl 6 N a 110 °C durante 24 hs. (197). La solución de hidrólisis contenía fenol (1 mg/ml) como protector de los residuos de tirosina (198). Una vez eliminado el ácido por secado al vacío sobre H_2SO_4 concentrado y NaOH sólido, el hidrolizado se disolvió en 0,05 ml de HCl 0,1 N y se procesó en un analizador de aminoácidos Beckman 119 CL, previamente calibrado por pasaje de una mezcla de 16 aminoácidos de concentración conocida. Los resultados fueron normalizados del siguiente modo:

moles AA(x)ba/ mol SBP = moles de AA(x)ba * S(AAh)/S(AAba)

moles AA(x)ba = n° de moles de un aminoácido x en la SBP de B. arenarum.; S(AAh)= sumatoria del número de moles totales por mol de SBP humana; S(AAba)= sumatoria del número de moles totales por mol de SBP de B. arenarum.

ESTUDIOS SOBRE REGULACION Y BIOSINTESIS

Relación entre el contenido endógeno de estradiol y la máxima capacidad de unión:

Para determinar si existía una relación entre la máxima capacidad de unión y el contenido endógeno de estradiol se hicieron determinaciones (durante el mes de octubre) del contenido de estradiol por radioinmunoensayo y de la máxima capacidad de unión mediante el método de Scatchard anteriormente mencionado (carbón/dextrano). Las determinaciones fueron hechas en distintos animales normales (por duplicado), incluyendo a un sapo macho.

Efecto del tratamiento con estradiol en animales normales:

En el mes de octubre se inyectaron 3 sapos con 1 μg de benzoato de estradiol/día (disuelto en aceite vegetal, 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) y 3 sapos con aceite (100 μl) durante 9 días. Se tomó sangre de la vena abdominal diariamente y se determinó la máxima capacidad de unión según el método de Scatchard señalado anteriormente (carbón/dextrano). Los resultados se expresan como (Q) vs tiempo transcurrido en días.

Efecto de la ovariectomía:

Durante el mismo mes se tomaron 2 sapos como controles y 4 fueron ovariectomizados. Dos de los ovariectomizados fueron inyectados con 1 μg de estradiol/día, durante 7 días. A los 7 días los animales fueron sacrificados y se determinó el contenido de estradiol (por RIA) y la máxima capacidad de unión como se indicó anteriormente (carbón/dextrano). El análisis estadístico de los datos fue hecho mediante el test de Student (199).

Técnica de aislamiento de hepatocitos e incubaciones de células y tejidos :

Los métodos utilizados, diseñados para este trabajo, se indican junto con los resultados obtenidos.

RESULTADOS

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA

Determinación de la constante de afinidad (Ka) y de la máxima capacidad de unión (Q):

Los resultados obtenidos para la unión de DHT, T y E2 a la SBP de B. arenarum se muestran en las figuras 1A, 1B y 1C respectivamente. Como puede observarse los gráficos de Scatchard son cóncavos; dicha concavidad puede tener distintos orígenes: heterogeneidad en los sitios de unión, presencia de más de una proteína con capacidad de unir al ligando, unión inespecífica, cooperatividad negativa, etc. Para el análisis de los resultados se consideró, en principio, que la concavidad se debía a la presencia de unión inespecífica. Los gráficos fueron descompuestos en dos rectas, correspondiendo la de mayor constante de afinidad (Ka1) a la SBP y la de menor constante de afinidad (Ka2) a la unión considerada inespecífica. Las concentraciones están referidas a litro de suero.

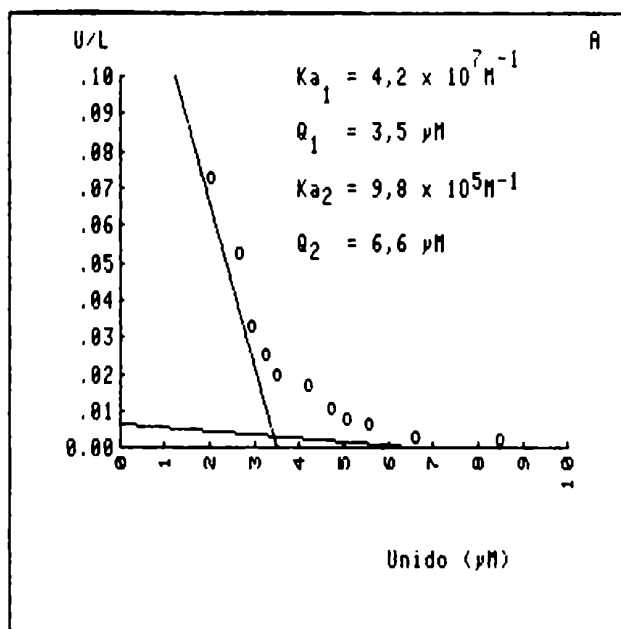


Figura 1 A: Gráfico de Scatchard correspondiente a la unión de dihidrotestosterona (DHT) a la proteína transportadora de esteroides sexuales (SBP) de *B. arenarium*. Los datos obtenidos se consideraron como el resultado de la suma de dos componentes y fueron analizados como tales. Las concentraciones se expresaron por litro de suero.

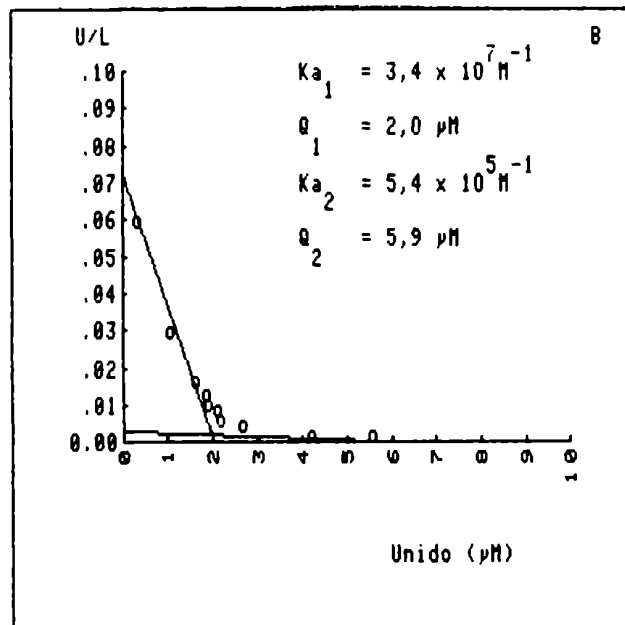


Figura 1 B: Gráfico de Scatchard correspondiente a la unión de testosterona (T) a la SBP. Nótese la menor afinidad y máxima capacidad de unión que presentan ambas componentes en comparación con los resultados obtenidos con DHT (figura 1 A).

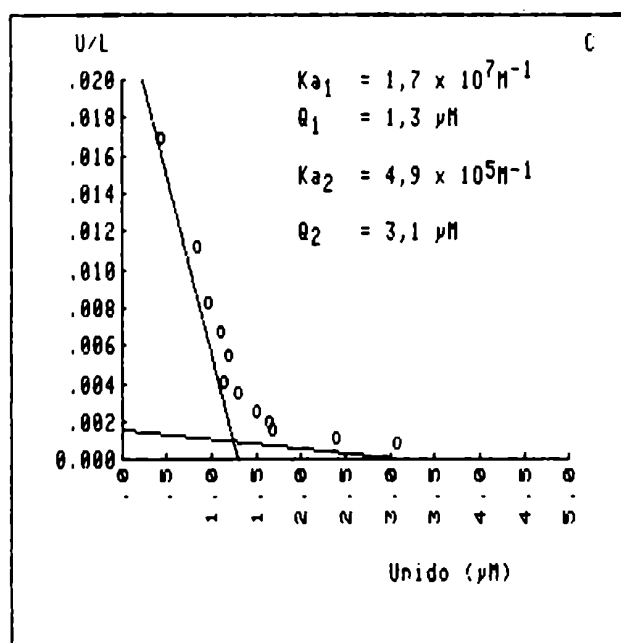


Figura 1 C: Gráfico de Scatchard correspondiente a la unión de estradiol (E2) a la SBP. En este caso los valores de la constante de afinidad y de la máxima capacidad de unión para ambas componentes son aún menores que en los casos anteriores (DHT > T > E2).

Determinación de la constante de velocidad de disociación:

La constante de velocidad de disociación puede determinarse mediante dos métodos distintos (200,201). En ambos el primer paso es una incubación en presencia del esteroide marcado para lograr la formación del complejo proteína-ligando. En el primer método, una vez alcanzado el equilibrio, se diluye el complejo hasta una concentración frente a la cual la reasociación sea despreciable y se determina la concentración de ligando unido en función del tiempo; en forma alternativa, en lugar de diluir se agrega un exceso de carbón para evitar la reasociación. Este último procedimiento permite trabajar sin tener que diluir excesivamente a la muestra, que generalmente trae como consecuencia pérdida de actividad.

En el segundo método se agrega un exceso de ligando frío, con el objeto de diluir la actividad específica del ligando libre de modo que la reasociación sea indetectable. Al usar este método hay que tener en cuenta que si existe cooperatividad negativa y ésta se manifiesta modificando la constante de velocidad de disociación, la constante calculada corresponderá al valor máximo. Por otro lado, si entre ambos métodos no se obtiene una diferencia

significativa, puede afirmarse que no existe cooperatividad negativa a menos que esté afectada la constante de velocidad de asociación.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos antes de modificar el método de separación del carbón mediante el uso de filtración en lugar de centrifugación. La línea superior corresponde al esteroide unido en función del tiempo frente a una dilución 1:20 luego de llegar al equilibrio (la concentración final de SBP era 160 nM). Como puede verse, ya en el primer tiempo medido se ha llegado a un nuevo estado de equilibrio (valores de %U constantes en el tiempo). Esto indica la existencia de una rápida velocidad de disociación, la que se hace también evidente al considerar los resultados obtenidos cuando la dilución se efectuó agregando al buffer una concentración saturante de DHT fría (línea inferior, fig.2). En este caso también se llegó a un nuevo estado de equilibrio en menos de 5 minutos (primer punto), siendo menor el % de DHT unida (%U) debido a la dilución isotópica.

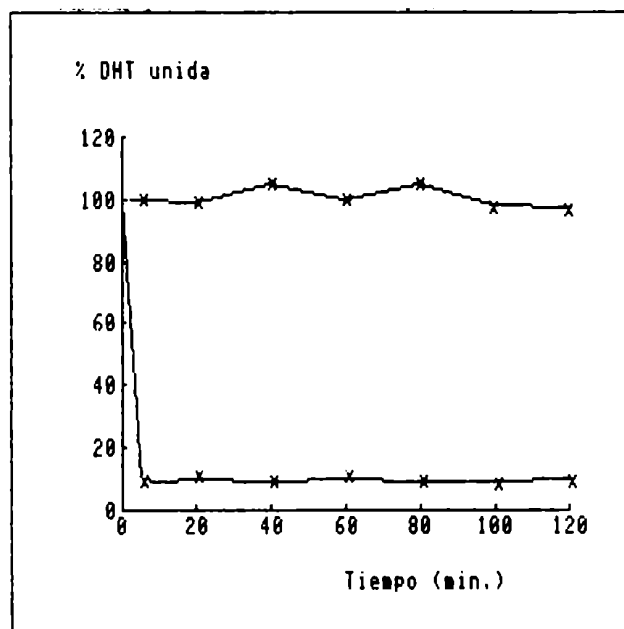


Figura 2: Cinética de disociación del complejo ³H-DHT/SBP. La línea superior corresponde a los valores de DHT unida luego de diluir (1:20) al complejo. La línea inferior corresponde a un ensayo equivalente al anterior, pero agregando un exceso de DHT no radiactiva al diluir. La constancia en los valores se debe a que el sistema llegó al equilibrio antes de la primera determinación. La línea inferior muestra menores valores de unión debido a la dilución isotópica.

Dada la rápida cinética obtenida, no se pudo determinar la constante de velocidad de disociación de esta forma y fue necesario modificar la técnica como se explica en materiales y métodos, con el fin de poder obtener mediciones en tiempos más cortos.

Además de la modificación en la forma de separar el carbón, y con el objeto de no diluir excesivamente a la SBP, se utilizó la segunda variante del primer método, es decir, se usó un exceso de carbón para evitar la reasociación del esteroide. Los resultados obtenidos de esta forma se muestran en la figura 3A y los obtenidos con exceso de DHT fría en la figura 3B. La constante de velocidad de disociación en el primer caso fue $k^{-1} = 0,019/\text{seg.}$ correspondiéndole una vida media de 36 segundos. Con el segundo método los valores obtenidos fueron $k^{-1} = 0,024/\text{seg.}$ y $t_{1/2} = 29 \text{ seg.}$

Constante de velocidad de asociación:

A pesar de la rápida cinética de disociación, se intentó determinar la constante de velocidad de asociación para la DHT diluyendo el suero hasta una concentración que permitiese obtener una curva de asociación dentro de un

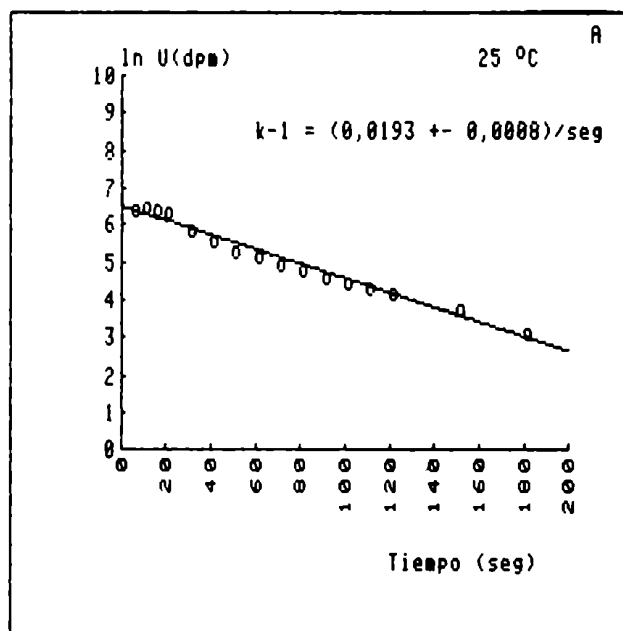


Figura 3 A: Cinética de disociación del complejo $^3\text{H-DHT/SBP}$ en presencia de un exceso de carbón/dextrano. Luego de la formación del complejo, se agregó un exceso de carbón dextrano (concentración final 1%/0,1%) y a los tiempos indicados las muestras se filtraron rápidamente. Los resultados corresponden a una cinética de disociación de primer orden. La recta se determinó mediante el método de cuadrados mínimos. Se indica el valor obtenido para la constante de velocidad de disociación y la desviación típica correspondiente ($n=16$).

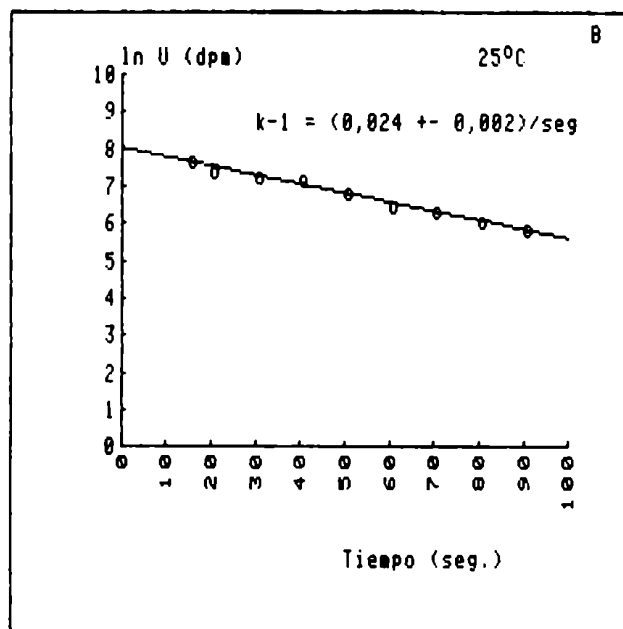
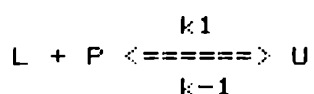


Figura 3 B: Cinética de disociación del complejo $^3\text{H-DHT/SBP}$ en presencia de un exceso de DHT no radiactiva. Luego de la formación del complejo se agregó un exceso de DHT no radiactiva y a los tiempos indicados la mezcla de carbón/dextrano (1%/0,1%); después de 10 segundos las muestras fueron rápidamente filtradas. Los resultados se analizaron como se indicó anteriormente (figura 3 A). La constante de velocidad de disociación aumentó un 24% con respecto al valor obtenido con el método anterior.

rango de tiempo adecuado. Además, corrigiendo la pérdida de unión durante la separación con carbón del esteroide libre (mediante la constante de velocidad de disociación antes calculada) y determinando la curva más probable por medio de cuadrados mínimos (desarrollando la función en serie de Taylor y derivando con respecto a Q y k1) sería posible determinar k1 y Q. Así podrían calcularse estos valores mediante un método cinético y compararlos con los obtenidos con el método de medición al equilibrio (Scatchard).

La concentración de SBF necesaria se estimó a partir de la ecuación correspondiente a una cinética de asociación bimolecular reversible. Considerando que la proteína tiene un único sitio de unión, el equilibrio involucrado es el siguiente:



Teniendo en cuenta que

L= concentración de ligando libre.
P= concentración de proteína libre.
U= concentración de ligando o proteína unida.
k1= constante de velocidad de asociación.
k-1= constante de velocidad de disociación.
H= hormona total = L+U
Q= proteína total = P+U

las ecuaciones diferenciales que definen al sistema son las siguientes:

$$(1) \quad dU/dt = L.P.k_1 - U.k_{-1} = (H-U).(Q-U).k_1 - U.k_{-1}$$

$$dL/dt = U.k_{-1} - L.P.k_1 = U.k_{-1} - (H-U).(Q-U).k_1$$

Si [H] es distinta de [Q] y definiendo $K_d = k_{-1}/k_1$ de (1) se obtiene:

$$dU/dt = k_1.(U-a).(U-b)$$

$$\text{con } a = 0,5.[H+Q+K_d + ((H+Q+K_d)^2 - 4.H.Q)^{0,5}]$$

$$b = 0,5.[H+Q+K_d - ((H+Q+K_d)^2 - 4.H.Q)^{0,5}]$$

(^ indica potenciación)

Por lo tanto,

$$dU/(U-a).(U-b) = k_1.dt$$

e integrando

$$(2) \quad U(t) = a.(1 - 1.\exp(t.k_1.(a-b)))/(1 - a.\exp(t.k_1.(a-b))/b)$$

Por otro lado, cuando se alcanza el equilibrio $dB/dt = 0$ y entonces $B_e = b$. Si se considera el valor de ligando unido correspondiente a un X % del valor de equilibrio, es decir $U(t) = X.U_e$, y se lo reemplaza en la ecuación (2), se obtiene luego de reordenar la ecuación (3):

$$(3) \quad 1 - X.(b/a) - (1-X).\exp(t.k_1.(a-b)) = 0$$

Con esta ecuación puede obtenerse el tiempo requerido para llegar al 90% de la unión al equilibrio. Para esto es necesario fijar un valor aproximado para k_1 . Teniendo presente el valor de K_d obtenido de los gráficos de Scatchard ($1/K_a$) y la relación $K_d = k_{-1}/k_1$, se estimó un

valor de $k_1 = K_a \cdot k^{-1} = 0,06/\text{nM} \cdot \text{min}$.

Con estos valores se resolvió la ecuación (3) mediante un método iterativo (el listado del programa se encuentra en el apéndice A) y se obtuvieron los valores indicados en la tabla I.

Tabla I:

[H]	[Q] (nM)	Tiempo (min)
0,2	0,1	1,0
0,2	0,5	1,0
0,2	1,0	1,0
0,05	1,0	1,0
2000	1,0	0,02

Como puede verse en la tabla, no hay diferencia en el tiempo requerido para llegar al 90% de la concentración de equilibrio en las condiciones indicadas. Por lo tanto, se diluyó el suero hasta 1 nM y con una concentración de DHT de 0,2 nM se intentó determinar la constante de velocidad de asociación mediante la técnica de separación por filtrado de la mezcla de carbón. Sin embargo, no se pudieron obtener resultados satisfactorios: debido a la rápida velocidad de disociación durante el tratamiento con carbón la dispersión de los resultados fue

muy grande.

Por otro lado, se notó pérdida de actividad en la SBP durante el tiempo requerido para las filtraciones. La pérdida de actividad al diluir el suero puede ocurrir por diferentes motivos: disociación de la proteína en subunidades inactivas, oxidación de la proteína por el oxígeno disuelto en el buffer, disociación de algún ión o cofactor, rápida disociación del complejo SBP-hormona y otros. Por razones que se discutirán posteriormente, se supuso como causa más probable una oxidación de la SBP por el oxígeno atmosférico.

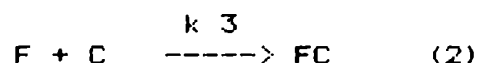
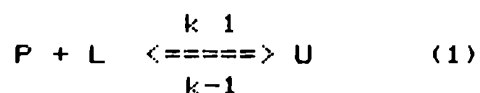
En vista de los resultados obtenidos, era necesario saber de qué forma afectaría la separación con carbón del esteroide libre a los resultados obtenidos durante la determinación de la constante de afinidad y de la máxima capacidad de unión. Para esto fue necesario simular el sistema con el fin de predecir su comportamiento frente a una alta velocidad de disociación y a altas concentraciones de SBP.

Simulación del sistema de separación con carbón dextrano:

El sistema de separación con carbón dextrano (o cualquier otro que no sea efectuado en condiciones de estado estacionario) es óptimo cuando la vida media del complejo ligando-proteína es mucho mayor que el tiempo requerido para la separación. Dado que la vida media del complejo DHI-SBP era de 29 segundos y el tiempo en contacto con el carbón con el método original era por lo menos de 1 minuto (aunque con un carbón mucho más diluido), existía la posibilidad de una subestimación de la máxima capacidad de unión. Además, como las condiciones de incubación eran tales que permitían una reasociación rápida del ligando, era posible que la K_a obtenida mediante este método de separación no fuese la real.

Por estos motivos fue necesario poder predecir el comportamiento del sistema de separación frente a distintas condiciones. Para lograr esto se necesitaba resolver el sistema de ecuaciones diferenciales no lineales que lo caracterizaban. Asimismo, la resolución de este sistema permitiría predecir la respuesta frente a diversas condiciones, ayudando sin duda a un mayor conocimiento del sistema y de sus limitaciones.

Considerando un único sitio de unión para la hormona, los equilibrios involucrados son los siguientes:



P=concentración de proteína libre.

L=concentración de ligando libre.

U=concentración de ligando unido.

Q=concentración total de sitios de unión.

C=concentración de carbón (suponiendo homogeneidad)

k₁=constante de velocidad de asociación.

k₋₁=constante de velocidad de disociación

k₃=constante de velocidad de asociación al carbón.

Considerando además que $P = (Q-U)$ el sistema de ecuaciones diferenciales que definen al sistema es el siguiente:

$$dU/dt = L \cdot (Q-U) \cdot k_1 - U \cdot k_{-1}$$

$$dL/dt = U \cdot k_{-1} - L \cdot (Q-U) \cdot k_1 - L \cdot C \cdot k_3$$

Este sistema de ecuaciones diferenciales no es lineal y no posee solución analítica. Sin embargo puede obtenerse una solución numérica con ayuda de una computadora (202a). Existen diversos métodos numéricos, cuya principal diferencia es el tiempo requerido para alcanzar la solución con una dada exactitud. La obtención de la condición de equilibrio del sistema lineal se necesitaba para calcular

el error del método y el momento en que se debía agregar el carbón al sistema. Si consideramos solamente el primer equilibrio (ecuación (1)) las ecuaciones diferenciales que lo definen son las consideradas anteriormente para el cálculo del tiempo necesario para llegar a un X% del valor de equilibrio. Como se vió:

$$b = U_e = (K_d + H + Q - [(K_d + H + Q)^2 - 4 \cdot Q \cdot H]^{0,5}) / 2$$

Conociendo el valor de U_e se puede fijar la condición de equilibrio de esta forma: si $(U - U_e) / U_e < e$ (donde "e" es el error permitido) entonces se ha alcanzado el equilibrio.

Para resolver el sistema no lineal se usó el método de Euler (ver teoría y aplicaciones de estos métodos en 202b) ya que el error obtenido con este método era muy pequeño (aprox. $1 \exp -8 \%$) y en un tiempo razonable. El método se basa en las siguientes consideraciones :

si T es el tiempo y X una variable, cuando $T_{n+1} - T_n \rightarrow 0$

$$dX/dT = (X_{n+1} - X_n) / (T_{n+1} - T_n)$$

por lo tanto

$$U_{n+1} = U_n + (T_{n+1} - T_n) \cdot (L_n \cdot (Q - U_n) \cdot k_1 - U_n \cdot k_2)$$

y

$$L_{n+1} = L_n + (T_{n+1} - T_n) \cdot (U_n \cdot k_2 - L_n \cdot (Q - U_n) \cdot k_1 - L_n \cdot C \cdot k_3)$$

Cuando el intervalo $(T_{n+1}-T_n)$ se toma lo suficientemente chico, el error que se comete en las aproximaciones es despreciable, siempre que la computadora pueda hacer los cálculos con la precisión suficiente. El error del método se estimó en el punto de equilibrio (antes de agregar el carbón) de la siguiente forma: $e\% = ((H-U-L)/H) \cdot 100$. Cuando fue necesario disminuir el error, en lugar de disminuir el incremento en $(T_{n+1}-T_n)$, se estipuló un incremento máximo permitido en las variables y el dt quedaba ajustado a esa condición. Este procedimiento acorta el tiempo de ejecución del programa. Para más detalles ver el programa en el apéndice B.

Como no se pudo obtener la constante de asociación se tomó el valor resultante de aplicar la relación $k_1 = K_a \cdot k^{-1}$. El valor de K_a fue el obtenido anteriormente mediante gráficos de Scatchard, suponiendo en principio que éste era el valor correcto. De esta forma k_1 se tomó igual a $K_a \cdot k^{-1} = 0,048/nM \cdot min$. Dado que el carbón tiene una capacidad muy grande, su concentración (suponiendo como aproximación que forma una solución ideal) puede considerarse constante durante la adsorción y figura como tal en las ecuaciones diferenciales. El valor de K_3 se

tomó igual a 0,05/nM y el valor de C fue variable. El tiempo en contacto con el carbón se fijó en 1 minuto.

Las otras variables del sistema se modificaron de manera distinta según el caso. Las condiciones iniciales para las cinéticas de asociación siempre fueron $U_0=0$, $k_3=0$ y el valor de H fue creciente, para poder obtener los distintos puntos de los gráficos de Scatchard.

Al alcanzar el sistema la condición de equilibrio $(U_n - U_e)/U_e < \epsilon$, se agregaba el carbón, es decir, a la constante de asociación por el carbón (k_3) originalmente definida como $k_3=0$, se le asignaba en ese momento su valor. A partir de ese punto el sistema deja de ser lineal y ya no tiene solución analítica. En todos los casos, se consideró la variación del volumen al agregar el carbón.

También se realizaron simulaciones considerando la presencia de dos sitios de unión (o de dos proteínas diferentes). El método usado fue similar, pero modificando las ecuaciones diferenciales de la forma siguiente:

$$dU_1/dt = (Q_1 - U_1) \cdot L \cdot k_1 - U_1 \cdot k_{-1}$$

$$dU_2/dt = (Q_2 - U_2) \cdot L \cdot k_2 - U_2 \cdot k_{-2}$$

$$dL/dt = U_1 \cdot k_{-1} + U_2 \cdot k_{-2} - L \cdot ((Q_1 - U_1) \cdot k_1 + (Q_2 - U_2) \cdot k_2 + C \cdot k_3)$$

y con la condición de equilibrio:

$$[U-Q1.k1.(H-U)/(k-1+k1.(H-U))-Q2.k2.(H-U)/(k-2+k2.(H-U))] < e.$$

<e.

donde $U = U1+U2$. Para más detalles ver el programa en el apéndice C.

Resultados de las simulaciones:

En la figura 4 se muestran resultados parciales de una simulación correspondiente al modelo de un sólo sitio de unión, realizada con el fin de ilustrar el modelo. Los valores utilizados fueron los siguientes: $H=200$, $Q=150$ y $C=100$ nM; $k1= 0,04788/nM.min$; $k-1= 1,14/min$; $k3= 0,05/nM.min$; $Tc= 3min$; $Ce=0,001$; $IcM=0,1$; En la figura de la izquierda se muestra la cinética de asociación y la variación de hormona total (Ht) en función del tiempo. Se alcanza rápidamente el equilibrio debido a la alta concentración de proteína presente. También se puede ver una discontinuidad en la curva correspondiente a la hormona total, debida a la dilución que se efectúa al agregar la mezcla de carbón/dextrano. En la figura de la derecha se ha graficado U (esteroide unido) vs L (esteroide libre) para distintos tiempos desde el momento

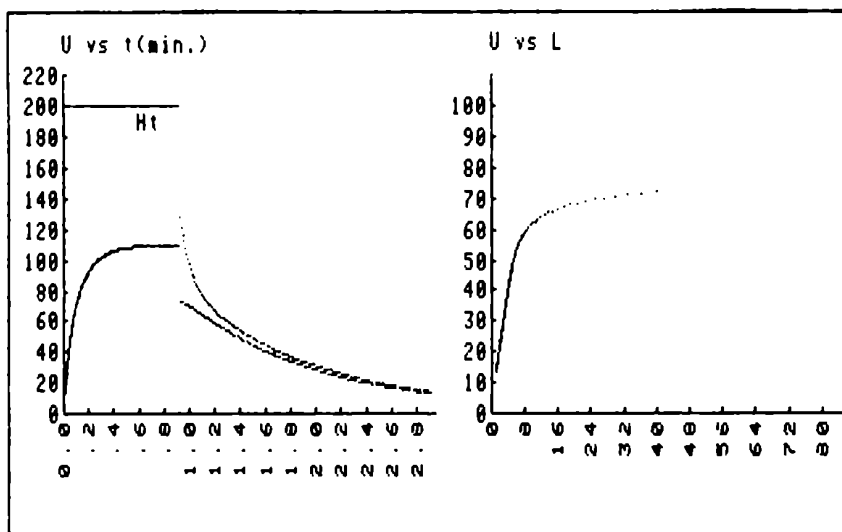


Figura 4: Simulación de la cinética de asociación del esteroide a la SBP y de la disociación luego del agregado de la mezcla de carbón. En el gráfico de la izquierda se indica la concentración de esteroide unido (U, línea inferior) y de hormona total (Ht, línea superior) en función del tiempo. La discontinuidad se debe a la dilución que ocurre en el momento de agregar el carbón (tiempo de llegada al equilibrio). En el gráfico de la derecha se indica la concentración de hormona unida (U) vs la concentración de hormona libre (L) para distintos tiempos después del agregado del carbón (crecientes hacia la izquierda). La constancia en los valores de Ht (calculados como U+L) antes del agregado del carbón demuestra la exactitud de la integración y el gráfico de la derecha indica claramente que el sistema no es lineal.

en que se agrega el carbón. Cada punto de la curva representa un tiempo distinto (creciente hacia la izquierda). Si el sistema fuese lineal, U vs L debería dar una recta (203). Claramente el sistema no es lineal.

En las simulaciones se realizaron variaciones en la concentración de carbón para ambos modelos (un sitio o dos sitios), determinándose en cada caso el gráfico de Scatchard correspondiente al equilibrio (K_a real o ideal, indicado con R en el gráfico) y el correspondiente a las concentraciones del sistema al finalizar la exposición al carbón (indicado con S). En este último caso la concentración de ligando unido fue considerada como la suma del unido más el libre ($U+L$) que es lo realmente medido al finalizar la separación del carbón.

En la figura 5 se muestra un gráfico de Scatchard no simulado, donde los resultados se han expresado en la misma forma que en las simulaciones, es decir, las concentraciones se indican por litro de solución y no de suero como en el caso de la figura 1A.

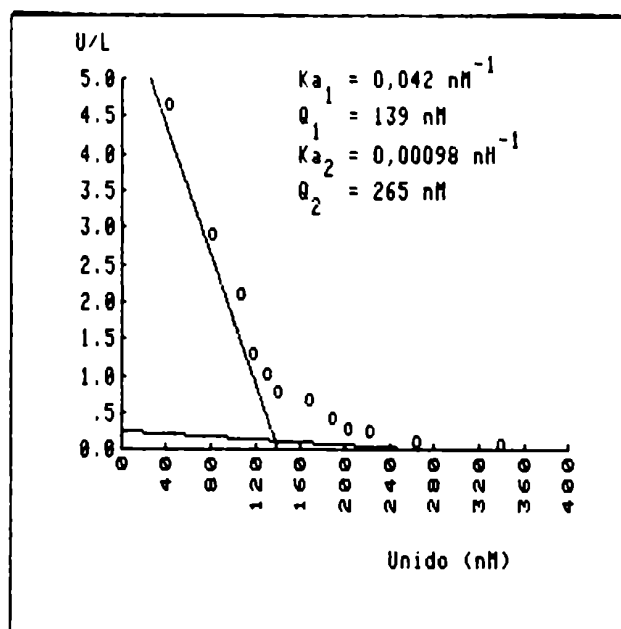


Figura 5: Gráfico de Scatchard correspondiente a la unión de DHT a la SBP. Las concentraciones están referidas al volumen de incubación y no por litro de suero como en la figura 1 A, es decir, se indican de la misma forma que en los resultados de las simulaciones.

En la figura 6 se muestran los resultados de una simulación utilizando los siguientes valores: $Q=139$ nM, $C=100$ nM, $K_a=0,042/\text{nM}$, $k^{-1}=1,14/\text{min}$. Los resultados indican que con $C=100$ nM debe existir subestimación en la máxima capacidad de unión (Q) y en la constante de afinidad (K_a). En las figuras 7A y 7B se muestran los resultados obtenidos al disminuir la concentración de carbón a 20 nM. En este caso, la subestimación en Q y K_a es menor, pero se observa la aparición de una segunda componente por arteificio de la técnica.. Sin embargo, con $Q=0$, la concentración de carbón que proporciona "blancos" similares a los obtenidos experimentalmente es la de 100 nM. Por lo tanto, la simulaciones indican que debe existir subestimación tanto en Q como en K_a , y que el segundo sitio no es producido por un arteificio de la técnica. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos con el modelo de dos sitios de unión usando los siguientes valores: $K_{a1}=0,042/\text{nM}$, $Q_1=139$ nM, $K_{a2}=0,00098/\text{nM}$, $Q_2=256$ nM, $C=100$ nM. El efecto es similar al obtenido con el modelo de un sólo sitio de unión (subestimación en Q y K_a).

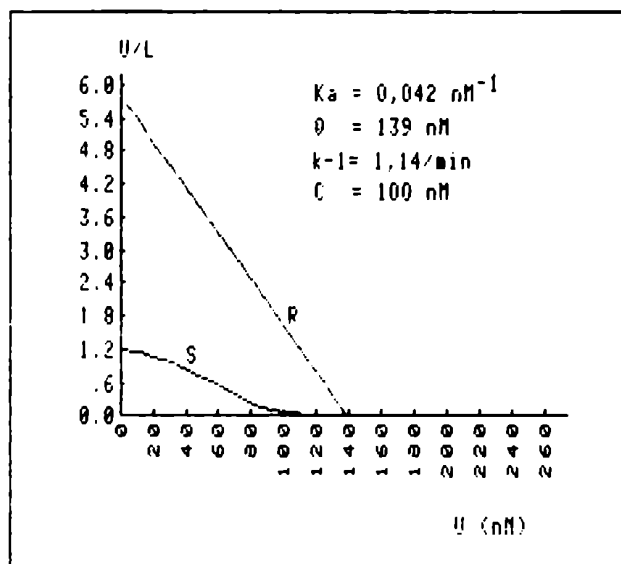


Figura 6: Gráfico de Scatchard correspondiente a los resultados de una simulación para el modelo de sitio único, realizada con los valores indicados en el gráfico. Con "R" se indica la recta que debería obtenerse si se pudiese medir la concentración de esteroide libre sin modificar el equilibrio (recta real). Con "S" se indica la recta que predice la simulación para el método de separación con carbón. Según el gráfico, con los valores indicados debería esperarse una subestimación tanto de la constante de afinidad como de la máxima capacidad de unión.

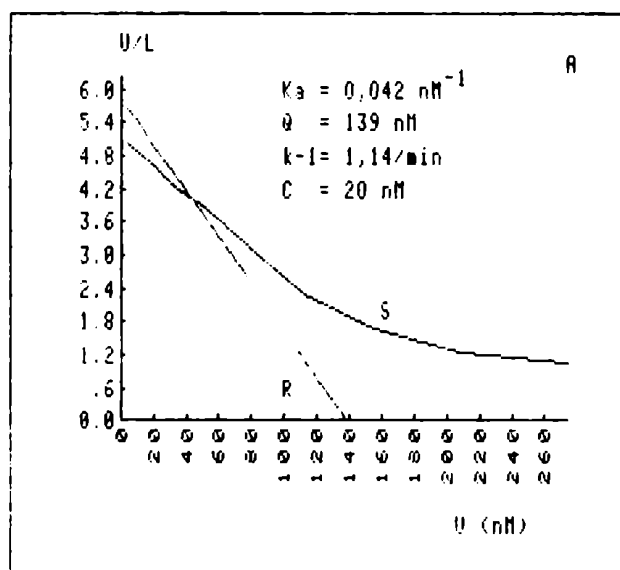


Figura 7 A: Simulación equivalente a la del gráfico anterior pero con una "concentración" de carbón menor. Puede notarse que en este caso la subestimación en el valor de la constante de afinidad es algo menor y que la subestimación en la máxima capacidad de unión es muy pequeña (ver resultados de la descomposición en dos sitios de unión en la figura 7 B). Aunque la simulación corresponde a un modelo de sitio único, los resultados indican que es posible la aparición aparente de un segundo sitio de unión, debido a un artificio de la técnica, si se usa un carbón muy diluido.

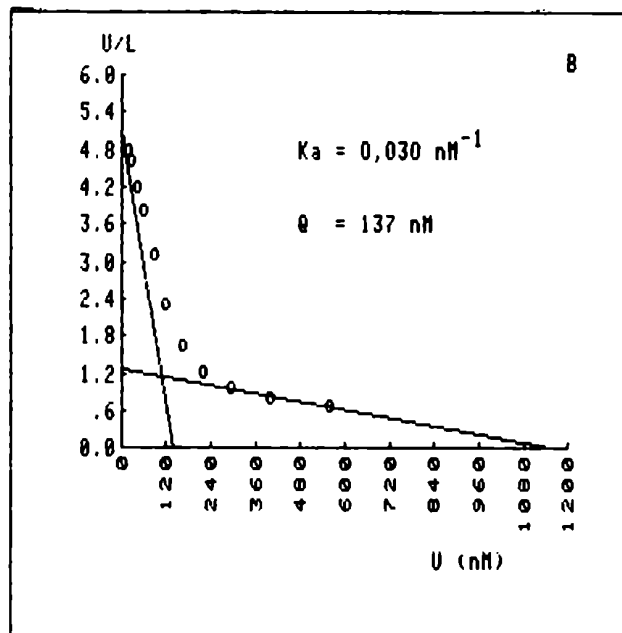


Figura 7 B: Descomposición de los valores correspondientes a la recta "S" del gráfico anterior. Comparando estos resultados con los de la figura 6 puede deducirse que, estando el carbón utilizado en la separación suficientemente diluido, la subestimación en la máxima capacidad de unión puede llegar a ser despreciable y la subestimación en la constante de afinidad muy pequeña.

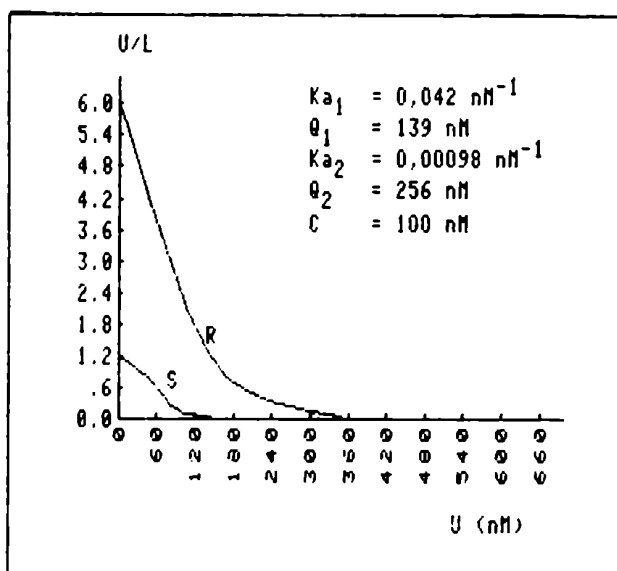


Figura 8: Simulación correspondiente al modelo de dos sitios de unión. Los resultados obtenidos son similares a los anteriores. En ambos modelos (1 ó 2 sitios de unión) con $C = 100 \text{ nM}$ se obtienen valores de "blancos" similares a los obtenidos experimentalmente. En consecuencia, las simulaciones indican que debería existir subestimación tanto en Ka como en Q , y que en la condiciones experimentales usadas no es posible la aparición de un segundo sitio por artificio de la técnica, como ocurriría con $C = 20 \text{ nM}$.

Determinacion de Ka y Q mediante electroforesis en estado estacionario:

Se usó en primer lugar el método de Ritzen (178), modificando únicamente el pH del gel separador (7,6 en lugar de 8,6). Para las determinaciones se usaron 20 μ l de suero y concentraciones crecientes de DHT (0-1 μ g/gel). Se hicieron numerosas determinaciones modificando las distintas variables sin obtener resultados coherentes: los gráficos de Scatchard eran discontinuos, convexos, etc,etc. Hasta el momento no se han podido determinar las causas de este comportamiento atípico.

En la figura 9 se muestra el perfil obtenido en un gel de estado estacionario. Aunque no se pudo determinar Ka ni Q con este método, el perfil obtenido sugiere la presencia de una única proteína con capacidad de unir DHT. Usando diferentes concentraciones de gel (4,6,8 y 10%) tampoco pudieron detectarse picos adicionales (los resultados no se muestran).

Para saber si existía o no subestimación en los valores obtenidos de Ka y Q, era necesario poder medir el esteroide unido de tal forma que no existiese pérdida del mismo durante la separación. Con ese fin se usó el método

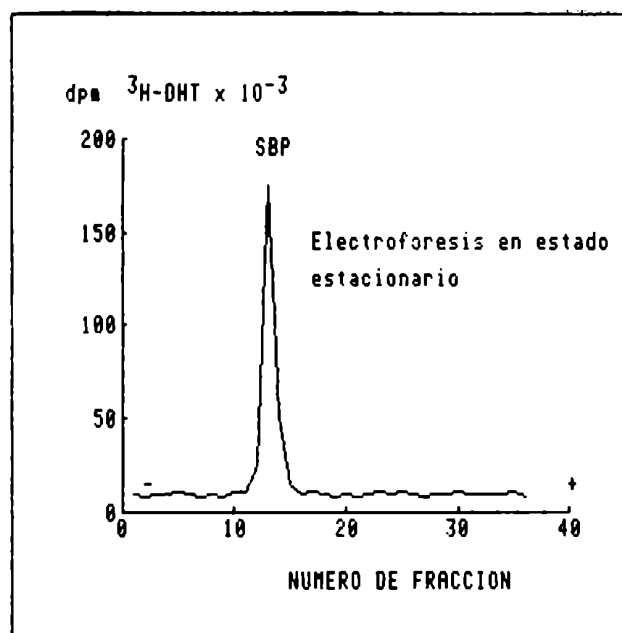


Figura 9: El gráfico corresponde a la unión de DHT a la SBP sérica durante una electroforesis en estado estacionario (gel al 7%). Resultados similares fueron obtenidos con geles al 4, 6, 8, y 10%. Puede notarse que existe un único pico de unión y como los geles tienen suficiente resolución como para poder distinguir la posición de la albúmina (fracción 22), puede deducirse que la DHT no se une a dicha proteína en forma apreciable. La SBP sería la única proteína con capacidad de transportar esteroides sexuales presente en el suero del B. arenarum.

siguiente: se realizaron incubaciones en las mismas condiciones usadas para la separación con carbón y luego, en lugar de separar el esteroide libre mediante filtración o centrifugación, se colocaron alícuotas de las muestras sobre geles de acrilamida al 7%, mantenidos a 25°C y se realizó una rápida electroforesis según el método general indicado en materiales y métodos. No se usó gel concentrador. A los 10 minutos de corridas la muestras, se sacaron los geles, se cortaron en fracciones y se sumó la radiactividad contenida en cada fracción después de extraer 12 hs con dioxano. Un par de geles fue usado como blanco (en ausencia de suero) para determinar la cantidad de esteroide que entraba en los geles por simple difusión.

Después de descontar los blancos y de hacer los cálculos correspondientes se obtuvo el gráfico indicado en la figura 10. Nuevamente se notó la presencia de dos componentes. Los valores de Q y K_a para el sitio de mayor afinidad fueron similares a los obtenidos por el método de carbón, y para el sitio de menor afinidad, K_a fue similar y Q mayor. En consecuencia, el método de carbón produce subestimación sólo en la máxima capacidad de unión del sitio de menor afinidad, cuando se usa DHT.

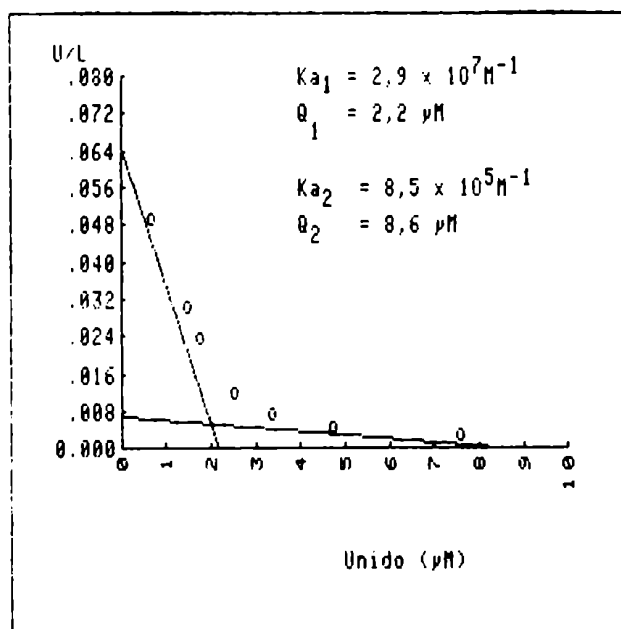


Figura 10: Gráfico de Scatchard correspondiente a la unión de DHT a la SBP, obtenido por separación electroforética del esteroide unido. El suero fue incubado en las mismas condiciones usadas con el método de separación por carbón/dextrano y luego el complejo DHT-SBP fue separado de la DHT libre por electroforesis. Los resultados obtenidos fueron similares para ambos métodos (ver figura 1 A), con excepción de Q2 que fue mayor en este caso.

Especificidad de la unión de DHT y estradiol a la SBP:

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos al desplazar la DHT y el estradiol (E2) radiactivos con distintos compuestos. Las concentraciones de DHT y estradiol utilizadas fueron de 1 nM y la de los competidores 1000 veces mayor (concentración saturante).

Tabla II: Especificidad de la unión de DHT y E2 a la SBP de B. arenarum.

Competidor	% H-DHT unida	% H-E2 unido
Control	100,0 +- 2,0*	100,0 +- 3,2*
Progesterona	108,4 +- 1,4*	99,1 +- 2,2*
Cortisol	107,9 +- 6,2*	111,3 +- 5,3*
Nafoxidina	104,0 +- 5,3*	106,5 +- 7,5*
Dietilestilbestrol	94,6 +- 0,7*	87,7 +- 2,2*
Etinilestradiol	83,4 +- 1,4*	76,2 +- 2,0*
R1881	36,4 +- 1,9*	45,6 +- 2,7*
DHT	17,2 +- 0,9	39,6 +- 3,0
Estradiol (E2)	15,5 +- 0,9	15,9 +- 1,8
Testosterona	11,3 +- 0,1	16,0 +- 0,4

* p < de 0,05 frente a E2 y DHT. Media +- SD (n=2)

Los resultados indican que únicamente los esteroides sexuales (DHT, testosterona y estradiol) producen un desplazamiento efectivo. El R1881 en menor grado y los estrógenos sintéticos no producen desplazamiento de la DHT

o del estradiol unido y tampoco la progesterona o el cortisol.

Efecto de la temperatura en la estabilidad de la SBP:

La SBP fue preincubada con DHT durante dos horas a distintas temperaturas y luego incubada dos horas a 0°C para determinar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la proteína. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos. La actividad de la SBP permaneció estable hasta aproximadamente 50°C. Con temperaturas superiores se produjo una marcada pérdida de la capacidad de unión y de manera irreversible.

Influencia del pH sobre la actividad de la SBP:

La figura 12A muestra la influencia del pH sobre la actividad de la SBP, cuando ésta fue incubada con una baja concentración de DHT (1 nM). La unión permaneció constante entre valores de pH 7 y 9. La pérdida de actividad a valores de pH menores que 5 y mayores que 10, se recuperó parcialmente por medio de una incubación posterior a pH 7,4. Dentro de éste rango de pH (5-10) la recuperación fue completa, es decir, el efecto del pH en esta zona es

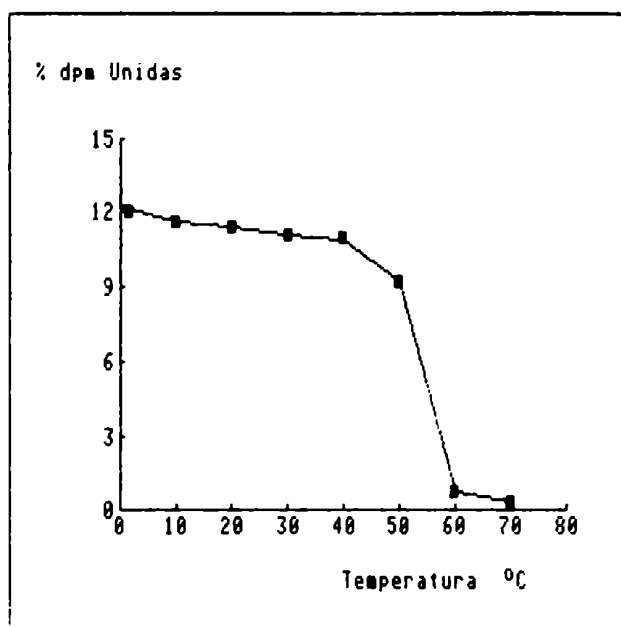


Figura 11: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la SBP. El suero fue incubado a distintas temperaturas durante dos horas, en presencia de una concentración saturante de DHT. Posteriormente se realizó una segunda incubación a 4 °C durante dos horas y finalmente se determinó el % de DHT unida. La proteína es estable en estas condiciones hasta 40 °C.

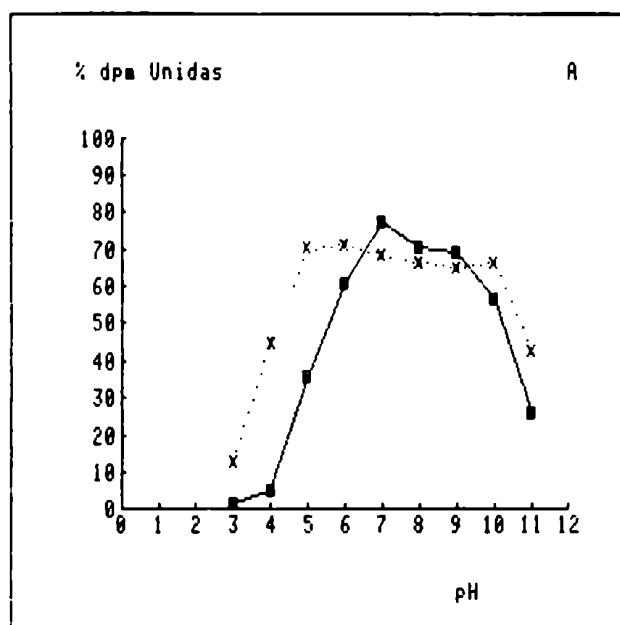


Figura 12 A: Efecto del pH sobre la estabilidad de la SBP a bajas concentraciones de DHT. La línea llena muestra los resultados obtenidos incubando el suero con un baja concentración de DHT (1 nM) a los valores de pH indicados. La línea punteada indica los resultados obtenidos con una incubación posterior durante dos horas a pH 7,4. El efecto sobre la actividad de la SBP es reversible entre pH 5 y 10. A pH 3 la pérdida de actividad es prácticamente irreversible.

reversible. Por otro lado, la irreversibilidad fue más marcada en los valores de pH extremos.

La figura 12B muestra los resultados obtenidos en las mismas condiciones pero con una concentración de DHT alta (400 nM). En estas condiciones el rango de estabilidad se extendió desde pH 5 hasta 11, indicando que el ligando protege a la proteína frente a valores de pH alejados del óptimo, siempre que no sean extremos. A pH 3 el efecto del pH es prácticamente irreversible. En este caso una incubación posterior a pH 7,4 dio resultados similares a los obtenidos con los distintos valores de pH.

Cuando la proteína fue mantenida una semana a -20°C en presencia de DHT (400 nM) la unión fue constante entre pH 7 y 8 (figura 13). Este resultado indica que el pH óptimo de almacenamiento está dentro de este rango. De aquí en más se consideró como óptimo un valor de 7,4 tanto para el almacenamiento como para las incubaciones.

Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de la SBP:

Se estudió el efecto de diversos cationes divalentes sobre la actividad de la SBP. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.

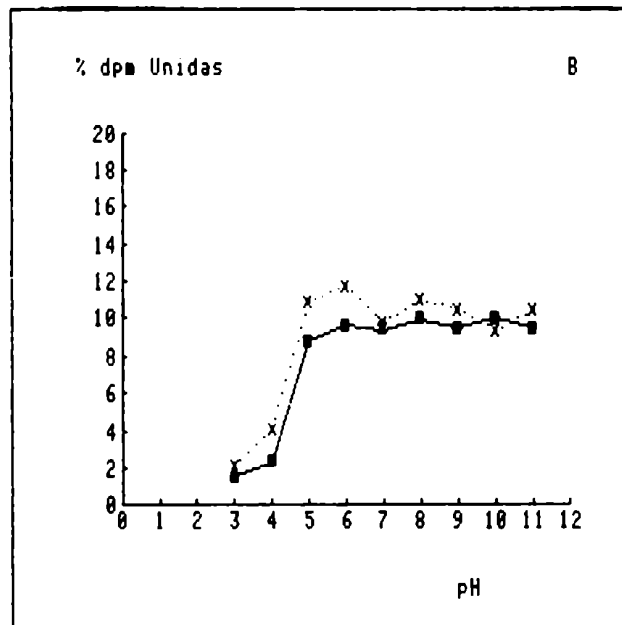


Figura 12 B: Efecto del pH sobre la estabilidad de la SBP a altas concentraciones de DHT. El suero fue incubado con una concentración saturante de SBP (400 nM) durante dos horas a distintos valores de pH (línea llena) y luego a pH 7,4 (línea punteada). En estas condiciones el rango de estabilidad se extendió desde pH 5 hasta 11, obteniéndose los mismos resultados con una incubación posterior a pH 7,4. Comparando estos resultados con los del gráfico anterior, puede notarse un efecto protector del ligando siempre que los valores de pH no sean extremos (<4,5).

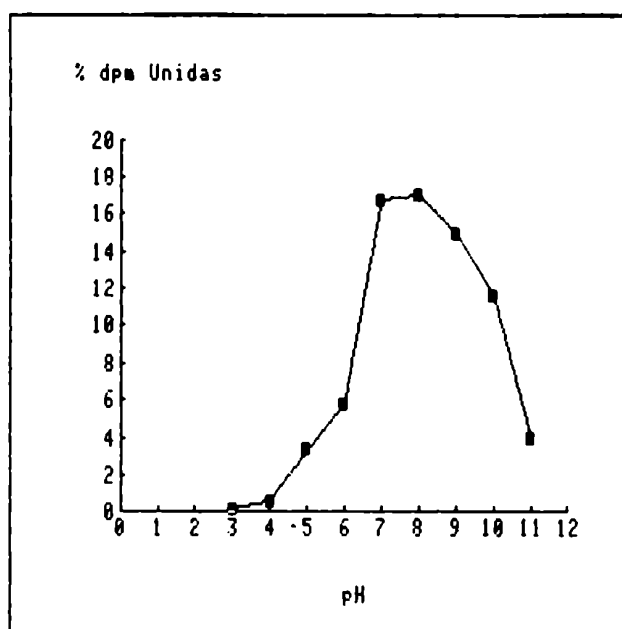


Figura 13: Efecto del pH sobre la estabilidad de la SBP mantenida durante 7 días a - 20 °C. El suero fue mantenido en esas condiciones con una concentración saturante de DHT (400 nm). Los resultados indican que el pH óptimo de almacenamiento se encuentra entre 7 y 8. Se consideró entonces un pH de 7,4 como óptimo para mantener la actividad de la proteína.

Tabla III: efecto de cationes divalentes sobre la unión de [³H]-DHT a la SBP de *B. arenarum*.

Cation	Unión realtiva %
Suero control	100 +- 2
Ca ²⁺ 50 mM	99 +- 3
Sr ²⁺ 50 mM	99 +- 2
Ba ²⁺ 50 mM	100 +- 5
Mg ²⁺ 50 mM	99 +- 1
Cd ²⁺ 50 mM	88 +- 1
Hg ²⁺ 50 mM	5 +- 1

Media +- desviación típica (n=2).

Tanto el Cd²⁺ como el Hg²⁺ tienen un efecto inhibitor sobre la actividad de la SBP, aunque el efecto producido por el mercurio es mucho más pronunciado. Existe una relación directa entre la inhibición producida por estos iones y su reactividad frente a los grupos sulfhidrilos. Esto indica que posiblemente un grupo R-SH (o más de uno) debe estar involucrado en la unión.

Rosner y col(165) habían descripto que el Ca²⁺ tenía un efecto protector sobre la SBP. Se estudió entonces el efecto del EGTA sobre la actividad de la SBP. En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV: efecto del EGTA y del Ca^{2+} sobre la unión de $[\text{H}^3]\text{-DHT}$ a la SBF de *B. arenarum*.

Tratamiento	Tiempo	Temp(°C)	Unión %
Control	6 días	4	100 +- 2
EGTA 10 mM	6 días	4	15 +- 1
EGTA 10 mM y luego Ca^{2+} 50 mM	6 días 1 día	4 4	40 +- 2
Control	2 hs	25	100 +- 1
EGTA 10 mM	2 hs	25	26 +- 8
EGTA 10 mM y luego Ca^{2+} 50 mM	2 hs 2 hs	25 25	100 +- 4

La incubación durante 6 días a 4°C en presencia de EGTA (10 mM) produjo un decaimiento de la actividad, obteniéndose una unión del 15% con respecto al control (sin EGTA). Luego de 6 días de incubación en las mismas condiciones se agregó un exceso de Ca^{2+} (50 mM). Se obtuvo de esta forma una recuperación parcial de la actividad hasta un valor del 40% con respecto al control.

Cuando las incubaciones se realizaron en las mismas condiciones pero con períodos de incubación de 2 hs y a 25°C la actividad en presencia de EGTA fue del 26%. En este caso, la incubación posterior en presencia de un exceso de Ca^{2+} produjo una recuperación total de la unión. Sin embargo, el efecto obtenido con el EGTA durante cortos períodos de incubación no fue muy reproducible y en algunos casos no existió inhibición alguna.

Efecto de N-etilmaleimida y de 2-mercaptoetanol sobre la actividad de la SBP:

Los resultados obtenidos con los iones de Hg y Cd sugerían que la presencia de un grupo R-SH libre era necesario para la unión. Para confirmar esta hipótesis se estudió el efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad de la SBP. Además se probó el efecto del 2-mercaptoetanol con el fin de determinar si este reductor era capaz de estabilizar a la proteína.

La figura 14A muestra el efecto de concentraciones crecientes de 2-mercaptoetanol (Et-SH) sobre la actividad de la SBP y la figura 14B el efecto de concentraciones crecientes de N-etilmaleimida (NEM) sobre dicha actividad.

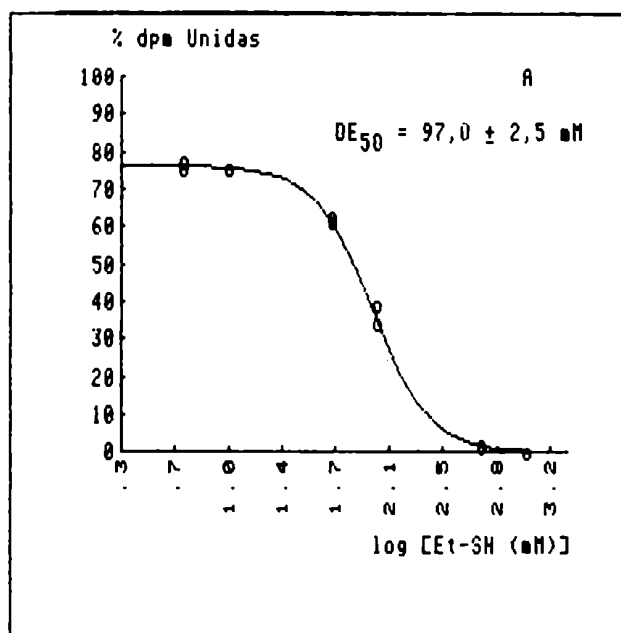


Figura 14 A: Efecto del 2-mercaptoetanol (ET-SH) sobre la actividad de la SBP. El suero fue incubado con concentraciones crecientes de ET-SH (0-1 M) durante dos horas a 25 °C y posteriormente se determinó el % de DHT unida. El ET-SH tiene un efecto inhibitor sobre la actividad de la SBP con una concentración efectiva 50% de 97 mM. Una pérdida de actividad del 77% fue obtenida manteniendo el suero durante 7 días a -20 °C con una concentración 1 mM de ET-SH.

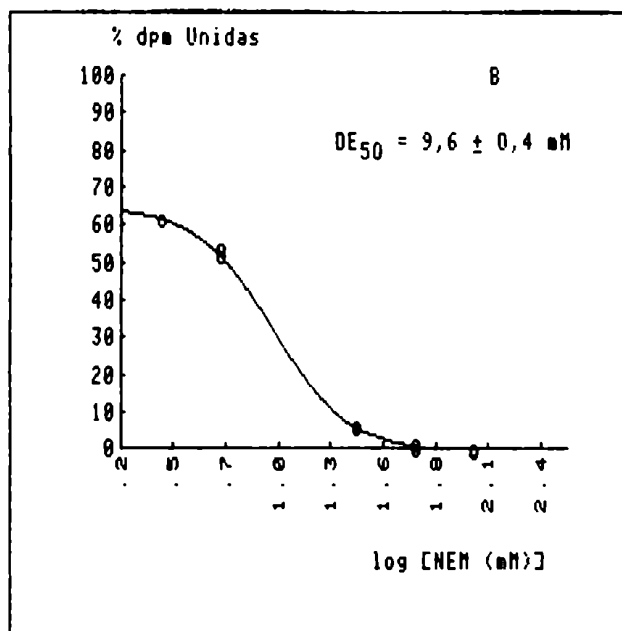


Figura 14 B: Efecto de N-etilmaleimida (NEM) sobre la actividad de la SBP. El suero fue incubado con concentraciones crecientes de NEM (0-0,1 M) durante dos horas a 25 °C y posteriormente se determinó el % de DHT unida. El NEM posee también un efecto inhibitor sobre la actividad de la SBP con una concentración efectiva 50% de 9,6 mM. El efecto de ambos compuestos (ET-SH y NEM) indica que al menos un puente disulfuro y un grupo sulfhidrilo están comprometidos en la unión del esteroide a la proteína.

Los resultados indican que los dos compuestos tienen un efecto inhibitor sobre la actividad de la SBP y que de algún modo están involucrados en la unión, o en el mantenimiento de una conformación adecuada, al menos un grupo sulfhidrilo y un puente disulfuro.

Con el objeto de determinar si el ligando era capaz de proteger el sitio de unión frente a estos compuestos, se realizaron incubaciones en presencia de 2-mercaptoetanol (50 mM) o de N-etilmaleimida (12,5 mM) con concentraciones crecientes de DHT. En todos los casos las muestras fueron preincubadas con el ligando durante dos horas y posteriormente se incubaron dos horas más en presencia de NEM o Et-SH.

En la figura 15A se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente al control, en la figura 15B el gráfico correspondiente a las incubaciones con Et-SH y en la figura 15C el que corresponde a las incubaciones con NEM. Los valores del control fueron similares a los obtenidos anteriormente. Tanto el tratamiento con NEM como con Et-SH produjo una disminución en la constante de afinidad sin afectar la capacidad, en consecuencia, el ligando protege al sitio de unión frente a estos reactivos.

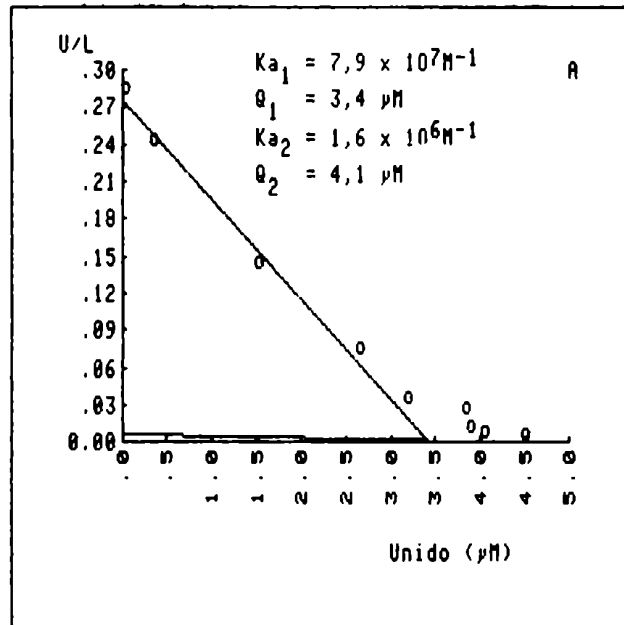


Figura 15 A: Gráfico de Scatchard correspondiente al suero control usado en las determinaciones del efecto del 2-mercaptoetanol y de la N-etilmaleimida en la actividad de la SBP de *E. arenarum* (ver figuras 15 B y 15 C respectivamente). El suero fue incubado con DHT durante 4 horas, en las mismas condiciones usadas para la determinación de la constante de afinidad (figura 1 A) e indicadas en el texto (materiales y métodos).

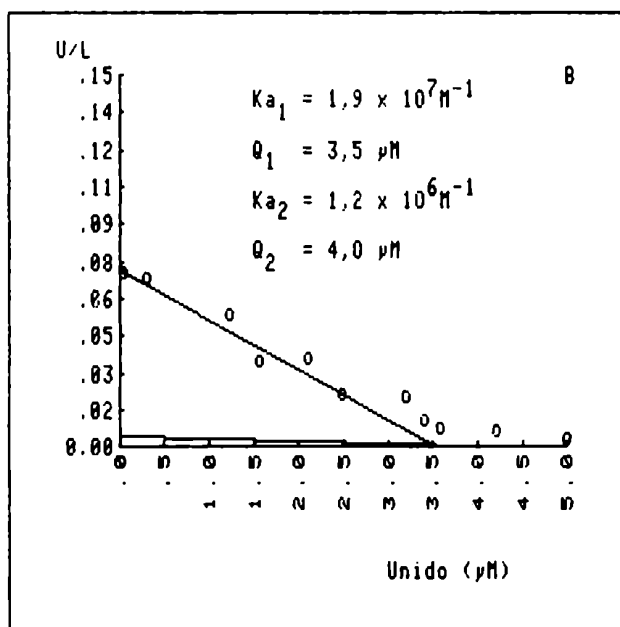


Figura 15 B: Gráfico de Scatchard correspondiente al suero preincubado durante 2 hs en las mismas condiciones que el control e incubado posteriormente 2 hs en presencia de una concentración 50 mM de 2-mercaptoetanol. Comparando los resultados con los del control, puede verse que para el sitio de mayor afinidad se modifica Ka y no Q , mientras que para el sitio de menor afinidad no hay modificaciones. Estos resultados indican que el ligando tiene un efecto protector sobre el sitio de mayor afinidad frente al reductor. En esta condiciones el Et-SH no afecta el sitio de menor afinidad.

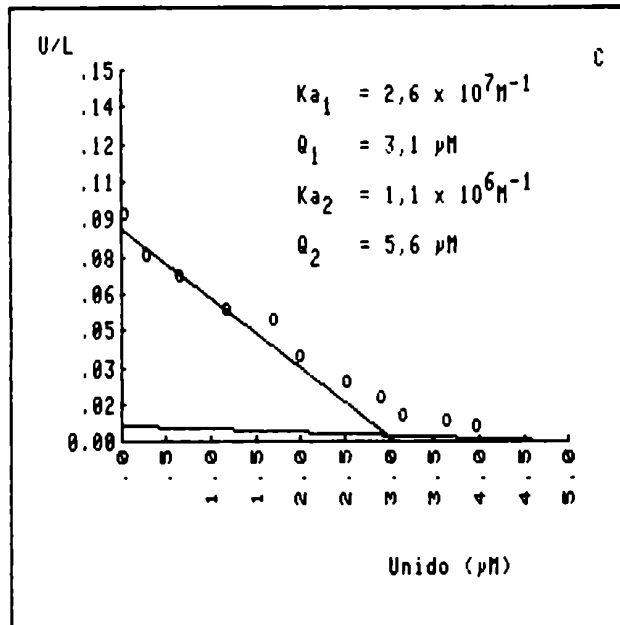


Figura 15 C: Gráfico de Scatchard correspondiente a las incubaciones en presencia de N-etilmaleimida (12,5 mM), realizadas en las mismas condiciones que se indicaron en las figuras 15 A y 15 B. Los resultados son similares a los obtenidos con 2-mercaptoetanol, es decir, el ligando protege al sitio de mayor afinidad frente la acción del reactivo. El sitio de menor afinidad no se vió afectado a esta concentración de NEM.

Posiblemente un grupo sulfhidrilo y puente disulfuro estén localizados en el sitio de unión o cerca de él. Sin embargo, aunque sea menos probable, no se puede descartar un efecto a distancia.

Los sitios de baja afinidad (considerados como tales si se supone que la falta de linealidad es consecuencia de una heterogeneidad en los sitios de unión y no de la existencia de cooperatividad negativa) muestran un menor grado de modificación a las concentraciones usadas de NEM y Et-SH. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que a concentraciones mayores (ver los resultados anteriores) la unión queda totalmente inhibida. En consecuencia, los sitios de baja afinidad también son sensibles a estos reactivos.

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la SBP:

Con el objeto de determinar la estabilidad de la SBP frente a un medio oxidante, se estudió el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la unión de DHT. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos al incubarse con concentraciones crecientes de oxidante. Una concentración

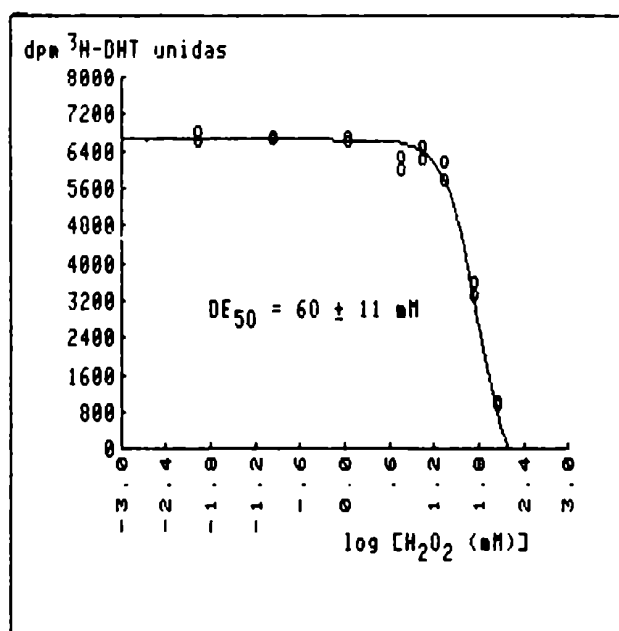


Figura 16: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la SBP. El suero fue incubado con concentraciones crecientes de agua oxigenada (0-100 mM) durante dos horas a 25 °C. La proteína es sensible a la oxidación cuando la concentración del oxidante es superior a 16 mM con una concentración efectiva 50% de 60 mM.

de 60 mM produce un 50% de inhibición de la actividad. Este dato deberá tenerse en cuenta si se desea marcar la proteína con el método Iodo/lactoperoxidasa

Por otro lado se estudió el efecto del Ca^{2+} y del EGTA frente a esta oxidación. En la tabla V se muestran los resultados obtenidos al incubar con una concentración de 30 mM de agua oxigenada en distintas condiciones.

Tabla V: efecto del Ca^{2+} y del EGTA sobre la oxidación con peróxido de hidrógeno (Ox).

Muestra	% DHT unida	p(control)
Control	88,3 +- 1,3	
Ox. 30 mM	72,6 +- 0,1	p<0,002
EGTA 10 mM	69,9 +- 1,3	p<0,002
Ca^{2+} 50 mM	89,5 +- 1,7	
Ox. + EGTA	12,1 +- 0,5	P<0,0001
Ox. + Ca^{2+}	68,3 +- 1,0	p<0,0026
EGTA + Ca^{2+}	89,7 +- 0,3	
Ox. + EGTA + Ca^{2+}	70,2 +- 1,5	p<0,003

Media +- sd (n=2); Student: p respecto del Control

Los resultados indican que el Ca^{2+} tiene un efecto protector muy importante frente a la oxidación. El tratamiento con EGTA produce una inhibición del 88% y puede anularse esta inhibición con el agregado de un exceso de Ca^{2+} .

Efecto de congelamientos sucesivos sobre la actividad:

Con el objeto de determinar la estabilidad de la SBP frente al congelamiento, se realizaron 5 congelamientos sucesivos. Se estudió simultáneamente el efecto del ligando (DHT, 400 nM) y del glicerol (10%) sobre estos congelamientos. La tabla VI muestra los resultados obtenidos.

Tabla VI: Efecto de congelamientos sucesivos sobre la actividad de la SBP.

Muestra	% cpm unidas
Control	8,1±0,1
Control + 5 cong.	8,5±0,7
DHT 400 nM	11,2±0,3 p<0,003
Glicerol (10%)	8,7±0,6
DHT + Glicerol	10,6±0,7 p<0,015

Estos resultados indican que no es necesario el agregado de glicerol para mantener la actividad de la SBP durante el almacenamiento, pero que una cantidad saturante de DHT produce un aumento significativo en la capacidad de unión, siendo este aumento progresivo (los datos de los congelamientos intermedios no se muestran en la tabla).

Coefficiente de sedimentación:

En la figura 17A se muestra el perfil obtenido en los gradientes de sacarosa luego de incubar las distintas fracciones con ³H-DHT y de determinar la unión específica. Por interpolación en la curva patrón (fig. 17B) se determinó el coeficiente de sedimentación, obteniéndose un valor de $s = 5,2 \pm 0,2$ S ($n=3, sd$). La desviación típica considerada es "intraensayo", dado que con ayuda de la referencia interna, los resultados fueron muy reproducibles y el error interensayo despreciable. De esta manera solo se manifiesta el error intrínseco de los valores de literatura para los patrones (IgG=7,12 S; Citocromo c=1,91 S; albúmina humana=4,6 S).

Determinación del radio de Stokes:

En la figura 18A se muestra el perfil obtenido al incubar con ³H-DHT las fracciones obtenidas de la columna de Ultrogel AcA 44. En el gráfico se indica la unión específica. Se construyó la curva patrón (fig. 18B) por medio de la relación empírica $K_{av} = a \ln(r) + c$ (179), donde r es el radio de Stokes y a, c son constantes empíricas.

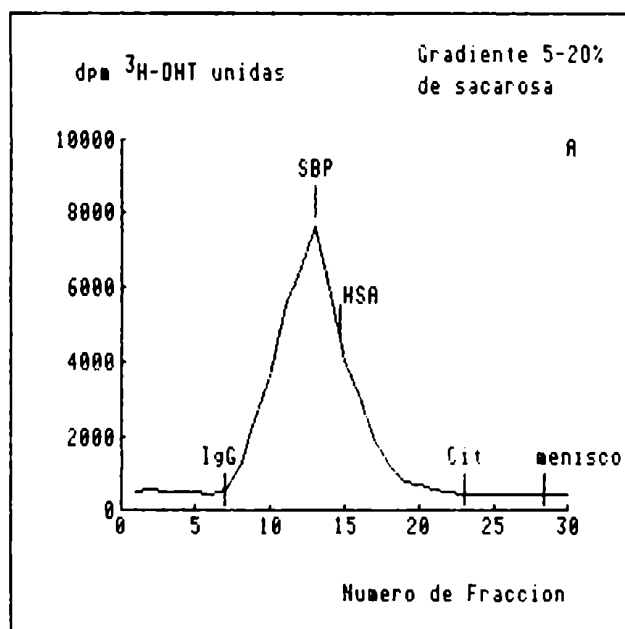


Figura 17 A: Determinación del coeficiente de sedimentación. En la figura se muestra el perfil obtenido mediante una centrifugación en gradientes de sacarosa (5-20%). Al finalizar la corrida, alícuotas de las fracciones fueron incubadas durante dos horas a 25 °C con DHT radiactiva, separándose luego el esteroide libre por adsorción con carbón. Tubos paralelos fueron incubados con exceso de DHT no radiactiva. En el gráfico se muestra la unión específica y se indica además la posición correspondiente a los patrones usados en la determinación del coeficiente de sedimentación.

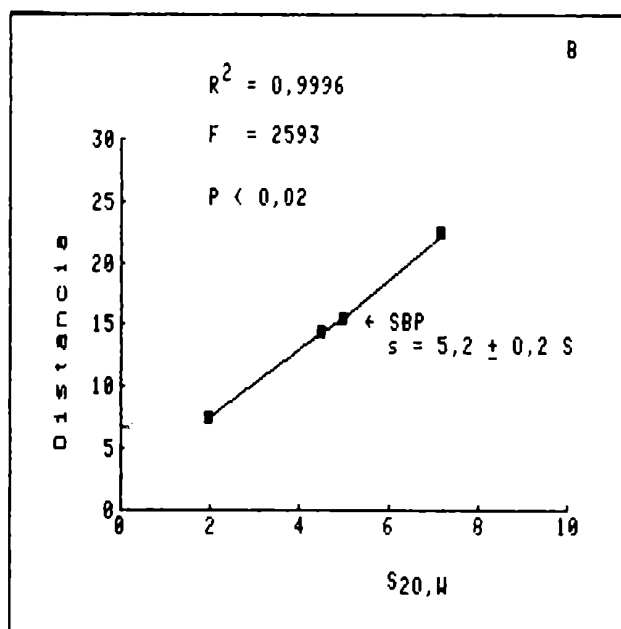


Figura 17 B: Determinación del coeficiente de sedimentación. Curva de calibración obtenida mediante el uso de patrones de coeficiente de sedimentación conocido corridos simultáneamente con el suero de B. arenarum en tubos paralelos. En todos los tubos se colocó citocromo c como referencia interna con el fin de comprobar la reproducibilidad de los gradientes. Por interpolación en la recta se determinó el coeficiente de sedimentación (5,2 S). El error indicado corresponde a la desviación típica (n=3) intraensayo.

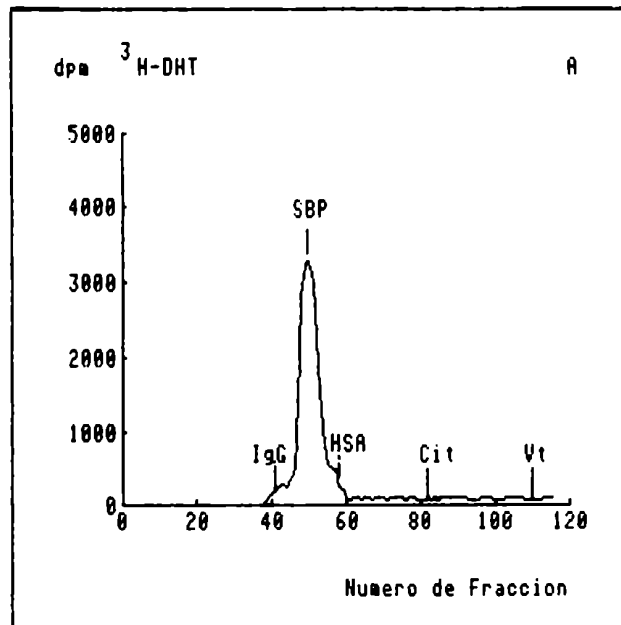


Figura 18 A: Determinación del radio de Stokes mediante filtración molecular en una columna de Ultragel Aca 44. Una muestra de suero (0,1 ml) fue pasada por la columna y posteriormente se determinó la unión específica de DHT a las distintas fracciones. En la figura se muestra la unión específica y se indica la posición de los patrones utilizados en la determinación del radio de Stokes.

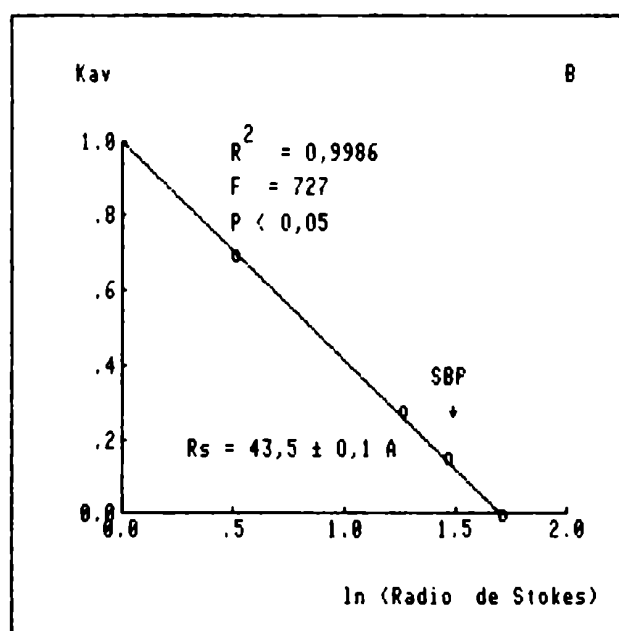


Figura 18 B: Determinación del radio de Stokes. Los valores de K_{av} obtenidos para los patrones durante la calibración de la columna de filtración molecular fueron graficados en función del logaritmo natural del radio de Stokes (en nm). Por interpolación se determinó el valor correspondiente a la SBP de *E. arenaarum* (43,5 Angstroms). El error indicado corresponde a la desviación típica intraensayo ($n=3$).

Por interpolación en la recta obtenida con los mismos patrones usados en la determinación anterior, se obtuvo un radio $r = 43,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$ ($n=3, sd$). Nuevamente aquí la desviación es intraensayo.

Determinación del peso molecular:

El peso molecular se determinó a partir del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación. El volumen específico parcial fue tomado como $\bar{v} = 0,725 \text{ cm}^3/\text{gr}$ (180). Con estos valores, el peso molecular calculado fue $M = 93.300 \pm 3600$.

Coefficiente friccional, relación axial/ecuatorial y radio de una esfera equivalente:

El coeficiente friccional obtenido fue $f/f_0 = 1,45 \pm 0,02$ ($n=3, sd$) para la forma prolato. Por resolución de la ecuación de Perrin (183) mediante un método iterativo y suponiendo a la proteína deshidratada, se determinó el valor de la relación entre el radio axial y el ecuatorial: $r_a/r_e = 8,3 \pm 0,4$ ($n=3, sd$). Por otro lado, el radio de una esfera equivalente deshidratada fue $r_e = 29,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$ ($n=3, sd$).

SINTESIS DE LA COLUMNA DE AFINIDAD

Adición de un reactivo de Grignard al carbonilo de la androsterona:

El primer paso fue la adición de una cadena lateral a la androsterona en posición 17 mediante la adición de un reactivo de Grignard. Luego de la reacción, extracción y revelado de la cromatografía analítica se obtuvieron 3 manchas de Rf 0,7 0,5 y 0,3. La mancha más cercana al frente de solvente tenía un Rf coincidente con el de androsterona (Rf=0,7) y la banda siguiente un Rf igual al del androstanodiol (Rf=0,5). Las reacciones secundarias de las adiciones con reactivos de Grignard a carbonilos son la enolización y la reducción. La primera, luego de la hidrólisis, conduce al compuesto de partida y la segunda a la reducción. Esto explica la presencia de estos dos compuestos luego de la reacción.

Posteriormente se purificaron los tres compuestos mediante cromatografía preparativa, se realizaron espectros IR de las tres y un espectro de masas (EM) de la tercera. Los espectros IR se hicieron para confirmar la presencia

del carbonilo (1715/cm) de la androsterona en la mancha de $RF=0,7$ y su ausencia en el compuesto reducido y en el de adición. El EM de la tercer mancha fue consistente con la estructura del compuesto buscado, es decir, 17α -(6-hidroxi-1-hexil)- 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol.

Asignaciones:

m1 (Rf 0,7): IR (1/cm): 3400 (OH), 2850 (C-H), 1715 (C=O).

m2 (Rf 0,5): IR (1/cm): 3300 (OH), 2850 (C-H).

m3 (Rf 0,3): IR (1/cm): 3200-3400 (OH), 2850 (C-H).

EM: M^+ (392,1%), $M-H_2O$ (374,8-9%), $M-2H_2O$ (356,8%),

$M-cad.lat.$ (291,100%), $M-cad.lat.-H_2O$ (273,28%),

$M-cad.lat.-2H_2O$ (255,15%), $M-cad.lat.-C_2H_3O$ (248,35%),

$M-cad.lat.-H_2O-C_2H_3O+H$ (231,50%), $M-cad.lat.-H_2O-C_2H_3O$

(230,38%), $M-cad.lat.-H_2O-C_2H_3O-CH_3$ (215,26%).

Posteriormente se oxidó este compuesto con el reactivo de Jones con el fin de obtener un grupo carboxilato en el extremo de la cadena lateral para poder unir el esteroide a la matriz. Luego de la reacción y de su purificación se realizó nuevamente un espectro de masas.

EM: M^+ (404,1%), $M-H_2O$ (386,1%), $M-H_2O-CH_3$ (371,10%),

$M-cad.lat.$ (289,100%), $M-c.l.-H_2O$ (271,35%),

$M-c.l.-C_2H_3O+H$ (247,50%), $M-c.l.-H_2O-C_2H_3O+H$ (229,13%).

El EM obtenido fue consistente con la estructura buscada pero la síntesis no resultó práctica porque el rendimiento final fue menor del 5%, muy bajo para obtener suficiente cantidad de material.

Con el fin de aumentar el rendimiento de la reacción se usó ter-butóxido de K como adyuvante. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, es decir, no pudo mejorarse el rendimiento de la reacción.

Reacción con una sal de litio:

Se utilizó como reactivo la sal de litio del 5-hexin-1-ol. Los resultados fueron similares a los anteriores, es decir, las reacciones secundarias eran predominantes y el rendimiento final menor del 5%. Con el uso de HMPT como adyuvante no pudo mejorarse el rendimiento de la reacción.

Reacción con una sal de K:

El rendimiento de la reacción fue similar. Se repitió con HMPT y tampoco mejoró el rendimiento.

Por último se probó el efecto de bloquear el hidroxilo en posición 3 sobre el rendimiento de la reacción anterior. Se usó dehidroepiandrosterona como ensayo para no consumir más androsterona. Los resultados tampoco fueron satisfactorios; el rendimiento continuó siendo menor del 5%.

Síntesis de hemisuccinato de androstanodiol:

Como no pudieron obtenerse buenos resultados con la adición al carbonilo, se realizó la síntesis de hemisuccinato de $3\beta,17\beta$ -androstanodiol con el fin de acoplarlo a la matriz del gel de agarosa. Con este compuesto quedaba bloqueado uno de los sitios de unión a la SBP (C-3, beta) y posiblemente no fuese efectivo. Sin embargo, dada la simplicidad de su síntesis, se decidió probarlo antes de seguir intentando la adición al carbonilo. En una primera etapa se sintetizó hemisuccinato de epiandrosterona y luego se redujo este compuesto con borohidruro de sodio. Al finalizar cada una de las dos etapas se derivatizó una fracción de cada compuesto con diazometano y se analizó la estructura por RMN-H.

Asignaciones:

comp. 1: RMN-H: δ = 0,83 (s, 3H, CH₃-18), 0,87 (s, 3H, CH₃-19), 2,65 (s, 4H, -OOCCH₂CH₂COO-), 3,71 (s, 3H, -COOCH₃), 5,05 (m, 1H, H-3).

comp. 2: RMN-H: δ = 0,74 (s, 3H, CH₃-18), 0,80 (s, 3H, CH₃-19), 2,66 (s, 4H, -OOC-CH₂-CH₂-COO-), 3,66 (m, 1H, H-3). El multiplete en 3,66 corresponde al H en posición 17 e indica que la reducción fue efectiva.

El rendimiento final fue del 65%.

Acoplamiento a la matriz:

Luego de sintetizar la diaminodipropilamino-sepharosa el hemisuccinato de androstanodiol anteriormente sintetizado se acopló a la matriz del gel por medio de una unión amida. El rendimiento final de esta reacción no se determinó. Sin embargo, una vez verificada la efectividad de la columna, pudo comprobarse que el gel tratado en forma similar pero en ausencia de hemisuccinato de androstanodiol no era capaz de unir SBP.

PURIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LA SBP PURIFICADA

Precipitación con sulfato de amonio:

Como primer paso de purificación se usó una precipitación del suero con sulfato de amonio. En la figura 19 se muestra el perfil obtenido durante la precipitación con sulfato de amonio. De acuerdo con los resultados obtenidos se eligió una concentración de 57% de saturación para la precipitación. El rendimiento obtenido en este paso fue del 76% y se indica en el cuadro de purificación (tabla VII)

Purificación por cromatografía de afinidad:

Después de la precipitación con sulfato de amonio se hicieron diversos ensayos con el fin de lograr la unión de la SBP a la columna de afinidad. El gel de afinidad fue previamente lavado con 10 volúmenes de dioxano 80%, 10 de etanol 50% y 20 de agua destilada con el fin de eliminar el esteroide libre remanente. Posteriormente se tomaron 0,5 ml de gel y se diluyeron con 7 ml de sepharosa CL-4B. A continuación se pasó el precipitado de sulfato de amonio correspondiente a 5 ml de suero y disuelto en 15 ml de

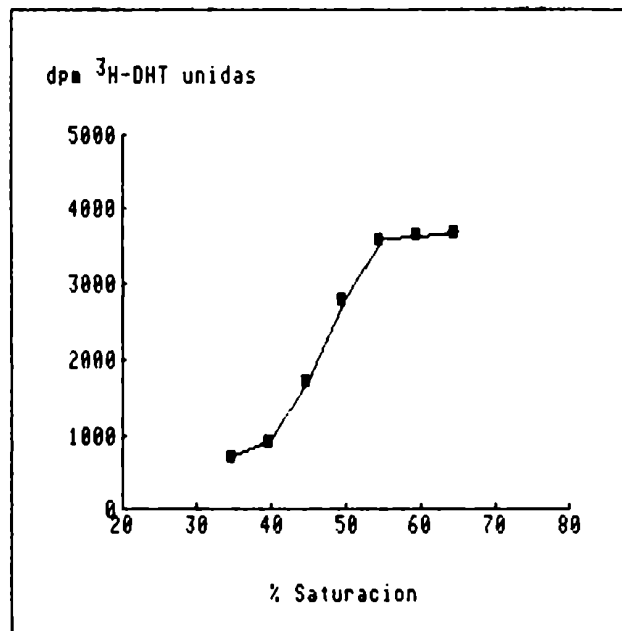


Figura 19: Precipitación con sulfato de amonio (100 % de saturación) de la SBP sérica. Los puntos representan la unión específica de DHT al suero (duplicados). Con un 60 % de saturación se consigue precipitar prácticamente toda la SBP contenida en el suero. Este método fue utilizado como primer paso de purificación (ver cuadro de purificación, tabla XI).

buffer (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 10%, pH 7,4 a 25°C). Todos los pasos fueron hechos a 0-4°C. Luego se lavó con buffer hasta que la densidad óptica a 280 nm fuese constante.

La máxima capacidad de unión del suero antes de ser pasado fue de $Q=4,26 \mu\text{M}$ y después de $Q=3,66 \mu\text{M}$. Aparentemente el 14% de la SBP se había unido a la columna. Se intentó eluir la proteína con el mismo buffer suplementado con 10% de dimetilformamida y 20 μg de DHT/ml, pero no pudo eluirse una SBP activa. Se intentaron diversas modificaciones (variación de la fuerza iónica, de la concentración de dimetilformamida, empleo de sales caotrópicas, aumento de la temperatura, etc.) pero de ninguna forma se consiguió eluir la proteína, que aparentemente estaba muy fuertemente unida a la columna.

Existía la posibilidad de que la proteína quedase fuertemente adsorbida a la matriz del gel, aunque esto parecía poco probable dada la baja constante de afinidad que tiene la SBP de *B. arenarum* en comparación con la SBP humana o la de los receptores de esteroides. Otra posibilidad era que existiese esteroide libre, producto de una hidrólisis química durante el tiempo transcurrido desde

los lavados hasta el sembrado de la muestra en la columna o de una hidrólisis enzimática (esterasas séricas) durante la separación. De existir suficiente cantidad de esteroide hidrolizado, este competiría con los sitios de unión en la matriz impidiendo la unión de la SBP a la columna. Por otro lado, el esteroide hidrolizado sería el responsable de la aparente disminución en la máxima capacidad de unión observada luego de pasar la muestra por la columna.

Para verificar esta hipótesis se repitió la separación, realizando un tratamiento con carbón/dextrano de las muestras antes de las determinaciones. Pudo comprobarse de esta forma que la máxima capacidad de unión antes y después de pasar la muestra por la columna era prácticamente la misma. En consecuencia, la SBP no se unía a la columna. Asimismo estos resultados indicaban que existía un compuesto inhibidor de la unión luego de pasar las muestras por el gel; este compuesto muy probablemente provenía de la hidrólisis del esteroide unido a la columna. Luego se trató todo el eluido con carbón/dextrano (0,1%/0,01%), se lo centrifugó 2x a 2000g, 10' y 2x a 10.000g 20' con el fin de eliminar el carbón. Se pasó nuevamente la solución por la columna y se repitió 8 veces este procedimiento.

En la figura 20 se muestra la unión de ^3H -DHT antes y después del tratamiento con carbón durante los 8 ciclos. Como puede verse, a partir del séptimo ciclo prácticamente no existe diferencia en el valor obtenido antes y después del tratamiento con carbón; esto indica que se ha eliminado el inhibidor posibilitando la unión de la SBP al gel. Por otro lado, el valor obtenido es constante e indica que a partir de ese ciclo ya no se une más SBP a la columna.

Luego de lavar la columna con el buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, glicerol 10%) hasta que la densidad óptica a 280 nm fuese constante, se agregó DHT (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, disuelta en el mismo buffer) y se determinó la actividad de SBP en el eluido previamente tratado con carbón. De esta forma pudo detectarse actividad de SBP. Aparentemente, los primeros pasajes de la muestra por la columna permitieron eliminar el esteroide hidrolizado, pudiendo unirse entonces la SBP a la columna.

Para mejorar el método se construyó una columna de sepharosa CL-4B con carbón adsorbido sobre su matriz, con el fin de colocarla en serie con la columna de afinidad. Para esto se suspendieron 3 ml de sepharosa con 100 mg de carbón y se agitó lentamente durante 10'. Se dejó decantar

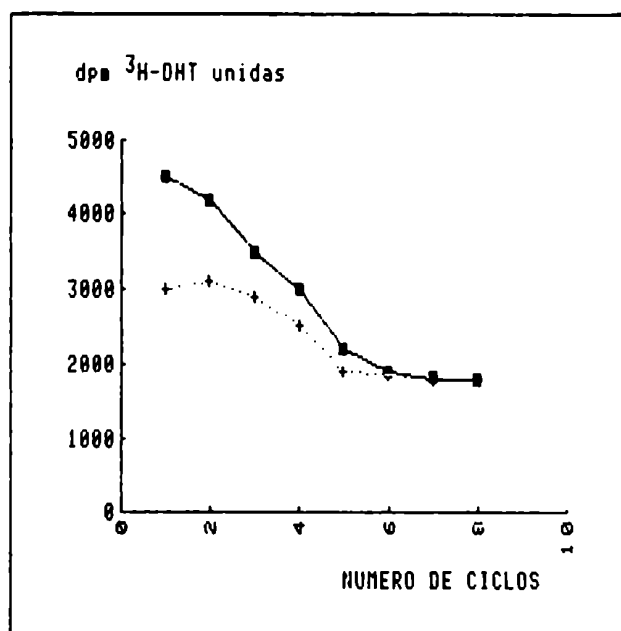


Figura 20: Unión de DHT al eluido de la columna de afinidad. Una muestra proveniente de la precipitación con sulfato de amonio fue pasada por la columna de afinidad. Posteriormente se determinó la unión de DHT antes y después del tratamiento con carbón (línea punteada y línea llena respectivamente). El procedimiento se repitió 8 veces. Puede verse que durante los primeros ciclos no existe una unión apreciable de la SBP a la columna de afinidad, debido probablemente a la presencia de esteroide liberado de la matriz del gel por hidrólisis química o enzimática. El aumento en la unión obtenido luego del tratamiento con carbón confirma la presencia de un competidor.

el gel y se descartó el sobrenadante. Esto se repitió hasta que la solución fuese límpida. Luego se agregaron 10 mg de dextrano (disueltos en 10 ml de agua) y se repitió el procedimiento. Finalmente se empacó el gel en una columna, se lo equilibró con el buffer de la muestra (Tris 50 mM, CaCl_2 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 a 25 °C) y se colocó la columna en serie con la de afinidad, equilibrando todo el sistema con el buffer de la muestra.

El agregado de CaCl_2 se realizó para aumentar la estabilidad de la SBP durante la separación. Como a esta concentración aparecía un precipitado en el suero, luego de la precipitación con sulfato de amonio se resuspendió el precipitado en este buffer y se agitó la solución durante 6 hs. Luego se centrifugó a 12,000g durante 30 minutos y se descartó el precipitado. De esta forma pudo simplificarse en gran medida el procedimiento. A continuación se sembró la muestra en la columna y el líquido se recicló hasta que la máxima capacidad de unión en el eluido fuese constante.

Los resultados obtenidos durante esta puesta a punto del método no se muestran porque son similares a los obtenidos finalmente en forma preparativa. Una vez comprobada la efectividad de la columna se ensayó la

capacidad de unión de una columna a la cual no se había unido el hemisuccinato de androstanodiol, dando resultados negativos. Para ensayar una purificación a mayor escala se sintetizaron 20 ml de gel de afinidad como se indicó antes y se lo diluyó hasta 50 ml con sepharosa CL-4B y se repitió el procedimiento anterior.

En la figura 21 se muestra un esquema del método de separación y los resultados obtenidos al determinar la actividad de unión del eluido mientras se reciclaba el líquido. Durante la separación, la columna de afinidad se mantuvo a 0-4°C. De esta forma se aseguraba una máxima eficiencia en la unión al disminuir la constante de velocidad de disociación y la actividad de las esterasas que pudieran estar presentes en la muestra. Por otro lado, la columna de carbón se encontraba a temperatura ambiente para lograr el efecto contrario, es decir, una rápida velocidad de disociación del esteroide unido a la SBF.

Cuando la actividad en el eluido fue constante se suspendió el reciclado, se eliminó la columna de carbón y se procedió a eluir la proteína como se indicó anteriormente. Al principio la elución se realizó a 0-4°C y luego a temperatura ambiente. El perfil obtenido

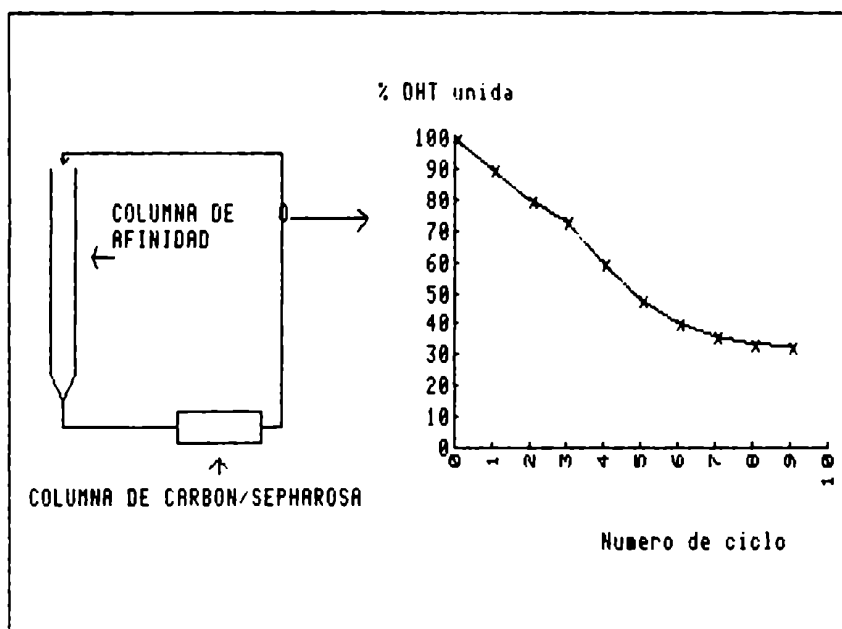


Figura 21: Esquema del método utilizado para la unión de la SBP a la columna de afinidad. Alícuotas del eluido de la columna de afinidad (mantenida a 0-4 °C) tomadas luego del pasaje por la columna de carbón/dextrano (mantenida a 25 °C) fueron incubadas con DHT radiactiva. En el gráfico de la derecha se indica el % de esteroide unido en cada ciclo. Luego de 9 ciclos se procedió a desconectar la columna de carbón y a eluir la SBP unida a la columna.

determinando la absorción a 280 nm y la unión específica de ³H-DHT se muestra en la figura 22. La máxima capacidad de unión obtenida al juntar todas las fracciones eluidas específicamente con DHT se muestra en el cuadro de purificación (tabla VII).

Las fracciones eluidas específicamente fueron concentradas dializándolas durante 5 hs contra el buffer de elución conteniendo 20% de polietilenglicol. Posteriormente, sobre alícuotas de 40 µg de proteínas se realizaron electroforesis en geles al 7%, detectándose una contaminación importante con albúmina y otras proteínas de mayor peso molecular que la SBP (ver fotografía, gel B). Un gel paralelo fue cortado en fracciones, extraído con dioxano durante 12 hs y contado. De esta forma pudo detectarse la banda correspondiente a la SBP. El perfil obtenido fue similar al indicado en la figura que corresponde a una muestra de SBP corrida luego de la electroelución del gel preparativo. La banda de SBP estaba lo suficientemente separada de la albúmina y del resto de las proteínas como para intentar una separación por electroforesis preparativa.

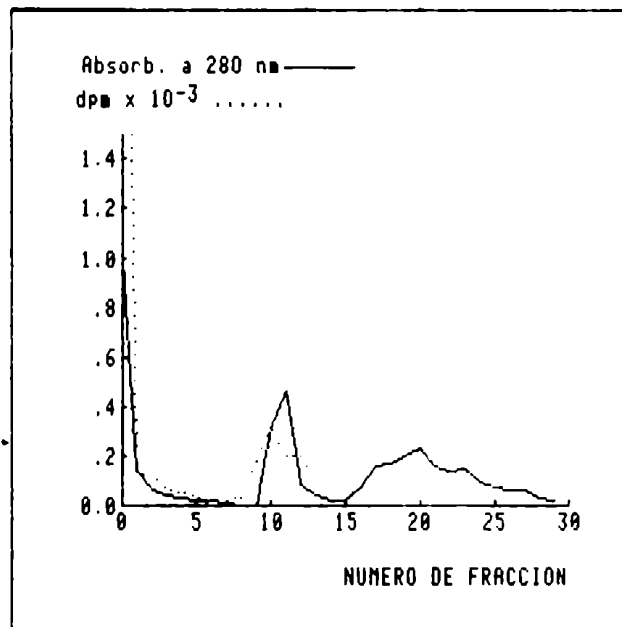


Figura 22: Perfil obtenido durante la elución de la baSBP unida a la columna de afinidad, mediante el agregado de un exceso de DHT. En cada fracción se determinó el contenido de proteínas y la actividad de SBP. Las fracciones 0-7 corresponden a las últimas fracciones del lavado antes de agregar la DHT en exceso. Las fracciones 9-15 corresponden a la elución a 0-4 °C y las fracciones 15-30 a la elución a temperatura ambiente (aprox. 25 °C). Las fracciones eluidas con DHT (9-30) se juntaron y se sometieron a electroforesis preparativa.

Electroforesis preparativa:

Para separar la SBP del resto de las proteínas contaminantes se utilizó una separación electroforética preparativa y luego una elución electroforética (204) de la banda correspondiente a la SBP.

Para la separación se utilizaron geles rectangulares (0,27 15 x 20 cm.) con una capacidad de 1 mg de proteína total cada uno. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas usadas en los geles analíticos. La única modificación fue el agregado de DHT (600 ng/ml de gel) con el fin proteger la actividad de la proteína. Finalizada la corrida, una fracción de los geles fue fijada con TCA 10% durante 15' y el resto del gel mantenido a 4°C. La fracción fijada fue luego teñida con el reactivo de Bradford durante 15'. Una vez localizada la banda correspondiente a la SBP, se cortó esa fracción y se procedió a eluir la SBP por electroforesis.

En la fotografía (gel C) se muestra el resultado obtenido al realizar una electroforesis analítica (gel al 7%) de la proteína obtenida luego de la electroelución del gel preparativo y en el cuadro de purificación (tabla VII) se indica el rendimiento de cada etapa y el grado de



La fotografía corresponde a las electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% de muestras de suero (A), eluido de la columna de afinidad (B) y electroeluido del gel preparativo (C).

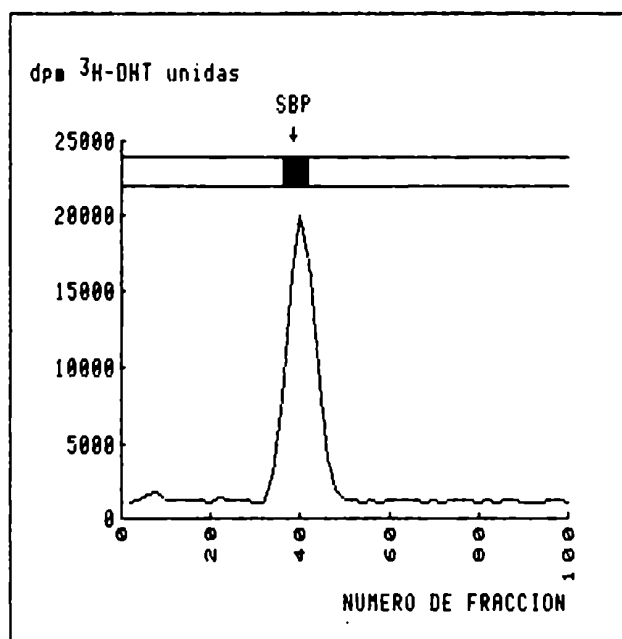


Figura 23: Perfil obtenido mediante electroforesis en estado estacionario de una muestra de SBP pura corrida en forma paralela con los geles de la fotografía. Se indica la posición de la SBP correspondiente al gel C. Con la muestra obtenida de la columna de afinidad se obtuvo un perfil similar que permitió localizar la posición de la SBP después de la electroforesis preparativa.

purificación obtenido. La proteína purificada de esta forma presentó una única banda tanto en geles al 7% como al 4,6,8 y 10%. En la figura 23 se muestra el perfil obtenido al cortar en fracciones un gel paralelo al gel C de la fotografía, realizado en condiciones de estado estacionario.

Tabla VII: Cuadro de purificación.

Etapa	[prot. (mg)]	U (μ g)	%Rec.	A.E.	Pur.Ac.	Rend.
Suero						
120 ml	6720	50,8	100	7,6	1,0	100
Sulf.						
Amonio	3700	38,7	76	10,4	1,4	76
Crom.						
Afinidad	29,4	21,0	55	715,6	94,7	41
Electrof.						
Prepar.	3,2	18,1	86	5656	748,1	36

U = DHT unida; % Rec = % de recuperación en cada etapa; A. E. = actividad específica (ng / mg.prot.); Pur. Ac. = purificación acumulativa; Rend. = rendimiento total. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. La unión de DHT se determinó con una concentración saturante (600 ng/ml).

Para confirmar la purificación a homogeneidad, determinar si esta proteína estaba compuesta por subunidades y el peso molecular de las mismas, se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes.

Electroforesis en geles conteniendo SDS:

En primer lugar se usó el método de Laemmli (192) corriendo las muestras a dos voltajes distintos (100 y 200 volts). En los geles se sembró 1 ug de proteína total para los patrones (Pharmacia Fine Chemicals) y 0,5 de la SBP. Luego de la corrida los geles fueron teñidos con Ag.

En la figura 24 se muestra la curva obtenida con los patrones y se señala la posición de las bandas correspondientes a la SBP. La proteína tiene un comportamiento evidentemente anómalo en este sistema, que se manifiesta como una microheterogeneidad. Nótese que al disminuir el voltaje a la mitad, la microheterogeneidad también disminuyó. Con el fin de comparar los resultados con los obtenidos en el humano, se utilizó el método de Weber y Osborn (193). Al realizarse con este método la separación a una fuerza iónica mayor y a un pH menor que con el método de Lemmli, la microheterogeneidad ya no se hizo evidente. En la figura 25 se muestra la curva de calibración y la posición de la única banda obtenida. Una muestra corrida simultáneamente pero sin tratamiento con

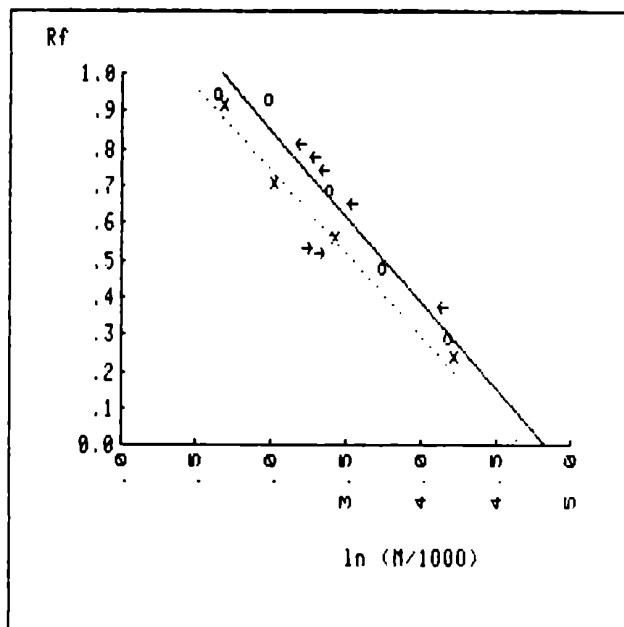


Figura 24: Electroforesis en geles de SDS según el método de Laemmli. En la figura se muestra la curva de calibración obtenida a 200 voltios (línea llena) y la obtenida a 100 voltios (línea punteada). Asimismo se indica la posición de la bandas obtenidas con una muestra de SBP proveniente de la electroforesis preparativa. La electroforesis a mayor voltaje pone en evidencia el comportamiento anómalo de la SBP (microheterogeneidad) típico de algunas glicoproteínas. Los pesos moleculares correspondientes se indican en la tabla XII.

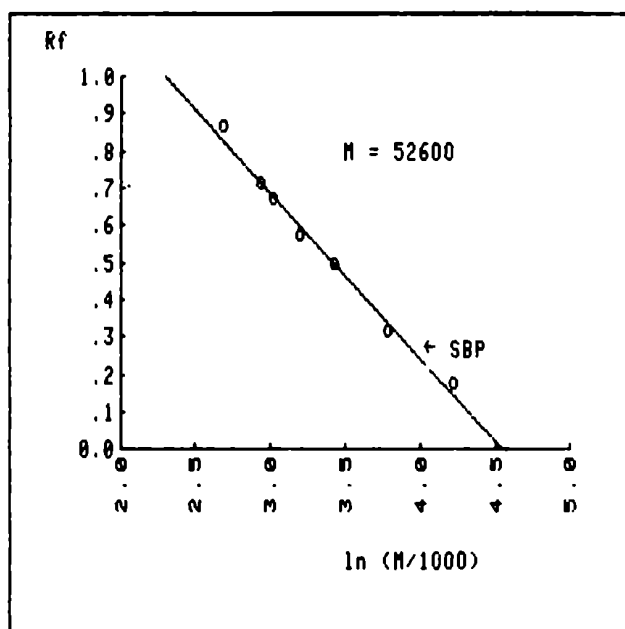


Figura 25: Electroforesis en gel de SDS según el método de Weber y Osborn. En la figura se muestra la curva de calibración obtenida a 100 voltios y la posición de la única banda visible luego de teñir el gel con Ag. El peso molecular obtenido fue de 53 K (ver tabla XII).

2-mercaptoetanol corrió con el mismo RF. El peso molecular obtenido con este método fue de 52.600. En la tabla VIII se muestran los pesos moleculares obtenidos con ambos métodos.

Tabla VIII: pesos moleculares obtenidos con geles en condiciones desnaturalizantes (SDS).

Método	Voltaje (voltios)	Rf	Peso mol.
Laemmli	200	0,80	24,3 K
	200	0,76	26,3 K
	200	0,73	27,5 K
	200	0,64	32,4 K
	200	0,36	53,7 K
	100	0,53	31,6 K
	100	0,55	30,6 K
Weber y Osborn	100	0,26	52,6 K
Weber y Osborn sin 2-mercaptoetanol		0,26	52,6 K

Unión a Concanavalina-A-sepharosa:

El comportamiento anómalo en geles de SDS es típico de algunas glicoproteínas. Hasta entonces no se tenía ningún indicio de que la SBP de B. arenarum fuese una glicoproteína como es el caso de la proteína humana y de las otras especies estudiadas (conejo, mono, etc.). Por este motivo se probó si la proteína era capaz de unirse a

una columna de Concanavalina-A-sepharosa. La lectina une preferentemente glicoproteínas que tengan manosas o glucosas terminales (esto último muy poco probable en proteínas secretadas). Para ello se pasó una fracción eluída de la columna de afinidad por la columna de lectina. Se lavó con buffer (Tris 50 mM, CaCl_2 50 mM, NaCl 150 mM) y posteriormente se eluyó con α -metil-D-manósido (0,4 M).

El perfil obtenido por medición a 280 nm se muestra en la figura 26. El análisis electroforético de las fracciones (sembrando en los geles igual volumen de cada fracción) indicó que el pico (a) era en su mayor parte albúmina, que la zona (b) contenía muy pocas proteínas y que en la zona (c), correspondiente a la elución con α -metil-D-manósido, contenía prácticamente toda la SBP (>90% por determinación de la unión de DHT a concentración saturante). En esta zona no existía contaminación con albúmina, aunque sí con otras proteínas de mayor peso molecular. Estos resultados indican que probablemente la SBP de B. arenarum sea una glicoproteína con manosas terminales. Asimismo la unión es prácticamente cuantitativa.

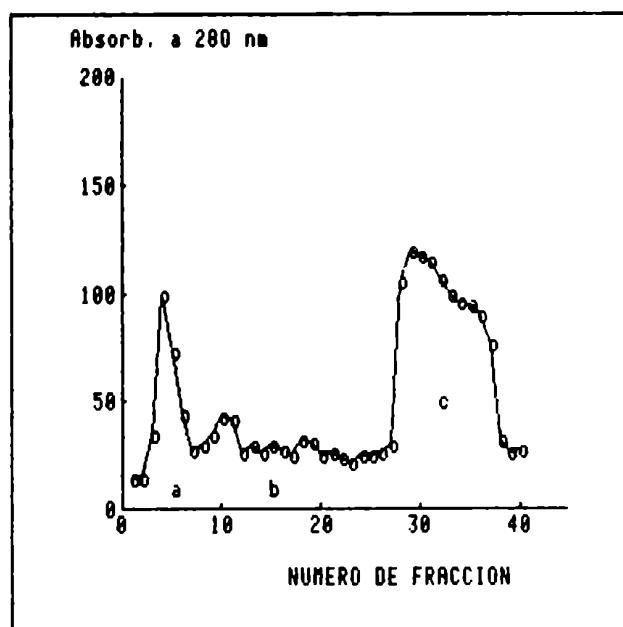


Figura 26: Unión a concanavalina A-sepharosa. En la figura se muestra el perfil obtenido (por medición de la absorbancia a 280 nm) al pasar una muestra del eluido de la columna de afinidad por una columna de concanavalina A (Pharmacia). Las fracciones fueron analizadas por electroforesis y por unión de DHT radiactiva. La fracción "a" corresponde a proteínas que no se unen a la lectina y contenía fundamentalmente albúmina, la fracción "b" corresponde a los lavados y la fracción "c", correspondiente a la elución con α -metil-D-manósido, contenía más del 90 % de la SBP sembrada, junto con otras glicoproteínas de mayor peso molecular.

Espectro de absorción y absortividad a 205/280 nm:

En la figura 27 se muestra el espectro obtenido con una muestra de SBP purificada, previamente dializada contra buffer bicarbonato (10 mM, pH 10). La determinación se realizó con dos concentraciones distintas de SBP (11,2 y 112 ug/ml). La muestra de mayor concentración permitió determinar con mayor precisión la zona cercana a 280 nm.

Por otro lado, la absortividad a 205 nm, determinada según el método descrito por R.K. Scopes (173) fue de $E(205) = 33,2 \pm 0,6$ ml/mg.cm (sd,n=2) La concentración obtenida mediante el método de Lowry, para una muestra de proteína pura, fue de 11,0 ug/ml y el obtenido con este método de 11,8 ug/ml. Los resultados obtenidos con la muestra más concentrada, que permitió ampliar los valores de absorvancia en la zona de 280 nm, fueron los siguientes: $E(280,1\%) = 19,6 \pm 0,3$ (sd,n=2); relación entre la absorvancia a 280 nm y la absorvancia a 260, $A(280)/A(260) = 1,2 \pm 0,02$ (sd,n=2). El valor de absortividad a 280 nm, obtenido por Petra y col. para la SBP humana fue de 15,5,

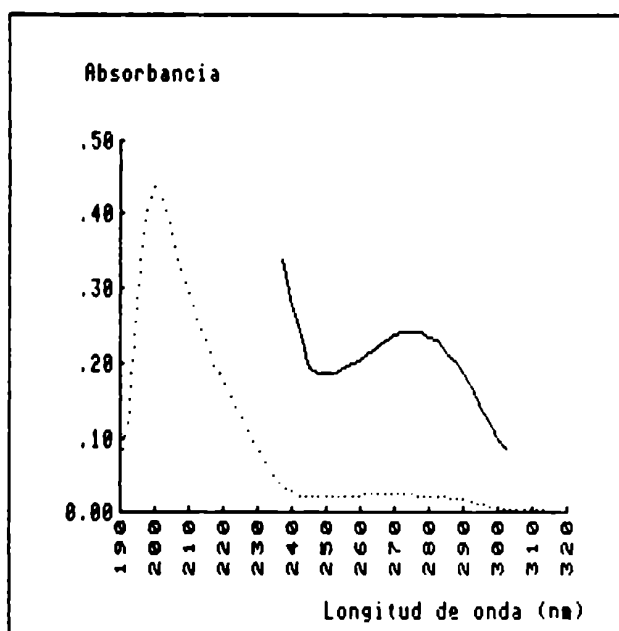


Figura 27: Espectro de absorción de la SBP pura. En la figura se muestra el espectro obtenido con una muestra de SBP pura, utilizando una concentración de 11,2 µg/ml (línea punteada). Asimismo se realizó un barrido con una concentración de 112 µg/ml (línea llena) para obtener una ampliación de la zona correspondiente a 280 nm.

Determinación de la composición de aminoácidos:

La muestra destinada al análisis de aminoácidos fue dializada contra un volumen 2000x de agua (deionizada y bidestilada) durante 24 hs, seis veces. Posteriormente fue hidrolizada y colocada en el analizador de aminoácidos. Los resultados se muestran en la tabla IX.

Tabla IX: Composición de aminoácidos de la SBF de B. arenarum.

A.A	mol/mol SBF
1-Lisina	29,9
2-Histidina	14,3
3-Arginina	28,9
4-Aspártico	73,9
5-Treonina	24,6
6-Serina	52,4
7-Glutámico	68,2
8-Prolina	34,6
9-Glicina	47,9
10-Alanina	46,9
11-Valina	57,3
12-Metionina	8,7
13-Isoleucina	25,3
14-Leucina	70,6
15-Tirosina	10,9
16-Fenilalanina	28,8

En la figura 28 se han graficado estos valores junto con los obtenidos por Turner y col. (205) con la SBF humana.

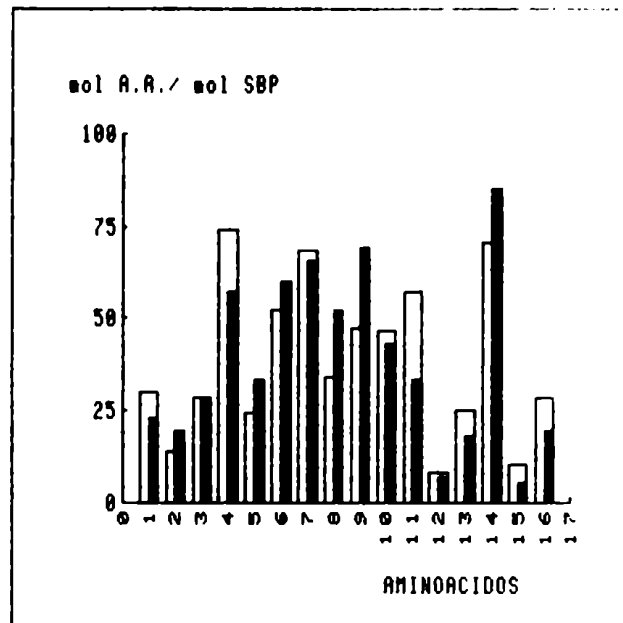


Figura 28: En la figura se ha representado la composición de aminoácidos de la SBP de *B. anthracis* junto con la composición obtenida por análisis con la SBP humana (barras llenas).

compos
 10
 (10)

REGULACION-INCUBACIONES DE CELULAS Y TEJIDOS

Relación entre el contenido endógeno de estradiol y la máxima capacidad de unión:

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la máxima capacidad de unión y del contenido de estradiol en animales con distintos valores de estradiol en suero. Evidentemente la concentración de SBP está relacionada con la de estradiol aunque no puede afirmarse que exista una relación causal. En todas las determinaciones realizadas la SBP estuvo en exceso con respecto al estradiol (30-1000 veces), aunque este exceso fue menor cuando la concentración de estradiol era más alta.

Efecto del tratamiento con estradiol en animales normales:

En la figura 30 se muestran los resultados obtenidos al tratar sapos adultos (hembras de 150 gr) durante 7 días con estradiol (1 $\mu\text{g}/\text{día}$). Los controles no presentaron modificaciones. Puede verse en el gráfico que existe un rápido incremento en la concentración de SBP durante los dos primeros días, manteniéndose prácticamente

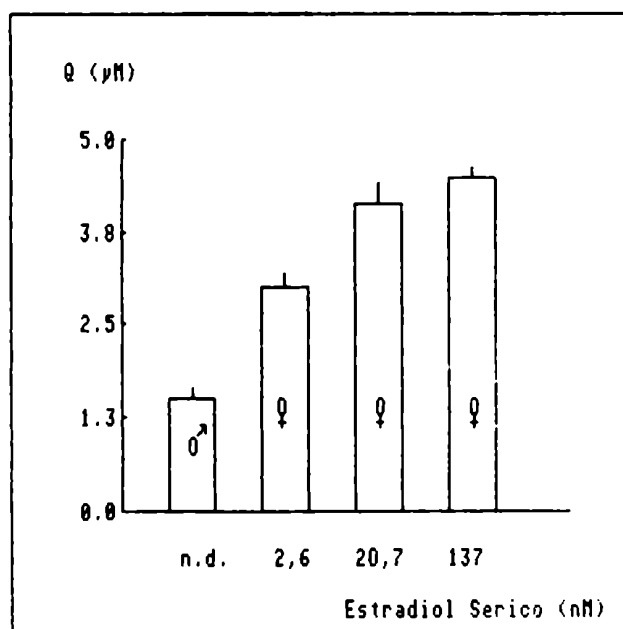


Figura 29: En la figura se muestran los valores de máxima capacidad de unión de DHT (duplicados, sitio de mayor afinidad), obtenidos utilizando hembras de *B. arenarum* con distinto contenido de estradiol. Se muestra también el valor correspondiente al suero de un sapo macho. A mayor contenido de estradiol, mayor cantidad de SBP se encuentra en el suero y en todos los casos la proteína se encuentra en exceso, asegurándose así su función de transporte.

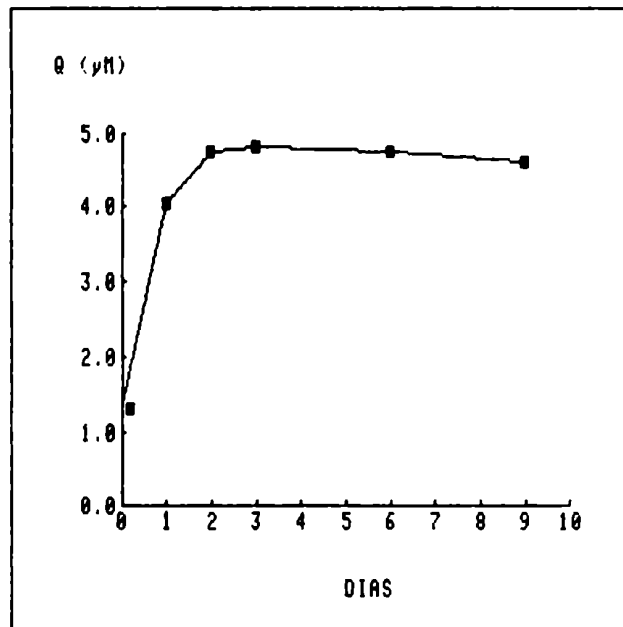


Figura 30: Efecto de la administración de estradiol a hembras de *B. arenarum*. Durante un período de 9 días se realizó la determinación de la máxima capacidad de unión de la SBP sérica (duplicados, sitio de alta afinidad) y la inyección de 1 µg de estradiol. En 48 hs el contenido de SBP aumentó aproximadamente 4 veces, manteniéndose luego prácticamente constante. Los animales controles no variaron su concentración de SBP.

constante durante el resto del tratamiento. Evidentemente el tratamiento con estradiol aumenta el contenido de SBP en animales normales. El paso siguiente fue determinar si el estradiol era capaz de mantener o aumentar los niveles de SBP en animales ovariectomizados.

Efecto de la ovariectomía:

En la tabla X se indican los resultados obtenidos los 7 días de haber sido ovariectomizados los sapos.

Tabla X: Efecto de la ovariectomía.

	[SBP] (μ M)	[Estradiol] (pg/ml)
Controles	3,51 \pm 0,01	540,3 \pm 56,6
Ovariect.	3,17 \pm 0,08 (a)	87,5 \pm 10,6 (b)
Ovariect. + estradiol	0,96 \pm 0,01 (c)	1612,5 \pm 17,7 (c)

Se indica el promedio \pm desviación típica (n=2).
a= p > 0,05 ; b= p < 0,005 ; c= p < 0,0001 ; d= p < 0,001.

Los animales operados presentaron leve pero significativa diferencia en la concentración de SBP con respecto a los controles y una marcada disminución en el contenido de estradiol. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los animales ovariectomizados e inyectados con

estradiol (con la misma dosis que en el ensayo anterior) presentaron una significativa disminución en la concentración de SBP. En estos animales el estradiol había aumentado más de dos veces debido a las inyecciones.

Aislamiento de hepatocitos:

Teniendo en cuenta el posible origen hepático de la SBP (206) y dado que en la bibliografía no existían datos sobre el aislamiento y cultivo de hepatocitos de anfibios, fue necesario desarrollar un método adecuado para las células del Bufo arenarum, a partir de los existentes para el aislamiento en mamíferos. En ellos se usan en general dos técnicas con buenos resultados.

La primera está basada en la utilización de colagenasa a 37 °C para disgregar el tejido (207), pero las células de anfibios tienen una temperatura óptima de 25 °C y no sobreviven una transferencia de 25 °C a 37 °C (208). En consecuencia, el uso de colagenasa fue descartado en un principio debido a que la enzima es muy poco activa a 25 °C. El segundo método se basa en el uso de complejantes de los iones de Ca y K. Al secuestrarse éstos, se debilitan irreversiblemente las uniones intercelulares y el tejido se

disgrega. J.C. Cresto y col.(209) han obtenido buenos resultados con este método en hepatocitos de rata. Se trabajó entonces usando una modificación de este método.

Como las células de anfibios requieren una osmolaridad menor que la de los mamíferos (230 mosm/l) se eliminó el NaCl de la solución de perfusión (albúmina 0,1 %, citrato de Na 8 mM, perclorato de Na 100 mM, oxígeno 100% de sat. y pH 7,4). El sapo fue previamente desmedulado y luego se ligó la vena porta y se canuló la vena abdominal (de mayor calibre). Posteriormente se trasladó el órgano aislado a una cápsula de Petry colocada sobre hielo. Se perfundió con el medio mencionado (mantenido aproximadamente a 10 °C) obturando a intervalos regulares vena hepática para aumentar la presión interna y facilitar de este modo la disgregación del tejido y la eliminación de las células sanguíneas. También se presionaron regularmente las distintas partes del órgano con el mismo fin. Cuando en el líquido de perfusión no se detectaron más glóbulos rojos se detuvo la circulación de líquido (aprox. entre 300 y 400 ml).

Aunque el tejido se disgregó bastante, este tratamiento no fue suficiente ya que era necesario romper mecánicamente abundantes fibras de colágeno (es mucho más fibroso que el de rata) para poder dispersarlo efectivamente y esto producía la destrucción de muchas células. Por otro lado, los agregados celulares eran muy abundantes. Se probó entonces una perfusión con colagenasa. Para ello fue necesario reponer el Ca^{2+} , pero como el efecto de los complejantes es irreversible, la recomposición de los niveles de Ca^{2+} y de K^{+} no presentaba inconvenientes. Para esto fue necesario diseñar un medio de incubación adecuado. Como no existían datos suficientes sobre concentraciones salinas en la especie B. arenarum, se tomaron datos promedio de concentraciones salinas en distintas especies de Bufo. En la tabla XI se indica la composición del medio usado.

Se perfundió con este medio durante 5' y luego 30' con 50 ml del mismo medio conteniendo 25 mg de colagenasa. Esta etapa se realizó a 25 °C y con reciclado del líquido de perfusión. De este modo se pudo disgregar fácilmente el tejido.

Tabla XI: medio de colagenización.

KCL	4,02 mM
CaCl ₂	1,80 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,22 mM
NaHCO ₃	23,81 mM
NaCl	82,13 mM
Glucosa	2,24 mM
Albúmina	0,05 %
CO ₂ /O ₂	5/95 %
pH	7,4
Rojo fenol	10,0 mg

Luego del tratamiento con colagenasa, se centrifugó 2 veces 100 g 10' resuspendiendo en el mismo medio y descartando el sobrenadante. Luego se centrifugaron la células en un gradiente discontinuo de Ficoll (5-10-20%, preparado en el mismo medio) a 160 g durante 10'. En la interfase del 5-10% quedaron retenidos los restos de células rotas y otras células. La interfase del 10-20% contenía solo hepatocitos y en el fondo había hepatocitos agregados. La viabilidad de la células determinada por exclusión de eosina fue mayor del 95%. Luego se colocaron las células en cápsulas de Petry con el medio indicado en la Tabla XII y se mantuvieron en él 12 y 24 horas. La viabilidad en ambos casos fue mayor del 90%.

Incubación de los hepatocitos aislados:

Se repitió el procedimiento anterior y los hepatocitos (1 millón/ml) fueron incubados en el medio de la Tabla XII durante 0, 12 y 24 hs en presencia de aminoácidos marcados (20 μ Ci/ml).

Tabla XII: medio de incubación.

Medio anterior (Tabla XI) +

Penicilina	100 U.I./ml
Estreptomina	0,1 mg./ml
Micostatina	100 U.I./ml
Gelatina	1 mg/ml

A los tiempos indicados, se tomaron los medios de incubación y se determinó mediante precipitación con TCA 10% la incorporación a proteínas. Por otro lado se estudió la unión de DHT a las proteínas del medio de incubación según las técnicas de Scatchard anteriormente mencionadas (carbón y electroforesis). La viabilidad de los hepatocitos fue mayor del 90% y se obtuvieron proteínas marcadas en el medio de incubación. Sin embargo no pudo detectarse actividad de SBP. Posiblemente el oxígeno atmosférico destruya a la proteína ni bien es secretada al medio de cultivo. Otra posibilidad es que las células

requieran alguna hormona, diferente del estradiol, para que se estimule la biosíntesis. También es posible que necesite un mayor tiempo de incubación.

Incubaciones con tejido entero:

Para descartar un posible daño durante el aislamiento se incubaron cortes de tejido de hígado y de ovario durante 12 y 24 hs en las mismas condiciones. Se probó con tejido ovárico porque el tratamiento con estradiol de animales castrados había producido una disminución en la concentración de SBP y existía la posibilidad de que el ovario fuese el responsable de la biosíntesis. En ningún caso pudo detectarse actividad de SBP.

DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que el Bufo arenarum posee una proteína transportadora de esteroides sexuales (SBP) con características similares a las encontradas en otras especies. La SBP de Bufo arenarum (baSBP) es capaz de unir en forma específica y orden decreciente de afinidades DHT, T y E2. En este aspecto los resultados coinciden con los obtenidos con la SBP humana (hSBP) (210). En el humano, dichos esteroides son transportados además por la albúmina (48) y en menor grado por la transcortina (211). La capacidad de transporte de la albúmina es muy alta aunque su constante de afinidad es mucho menor en comparación con la hSBP; de este modo, el transporte es compartido por las tres proteínas. En el Bufo arenarum los resultados indican que la baSBP es la única proteína con capacidad de transportar los mencionados esteroides y quizás por este motivo se encuentre en el suero en concentraciones micromolares, mientras que en mujeres normales su concentración es de aproximadamente 60 nM (212)

Otra posible explicación para la alta concentración de esta proteína en el suero, surge de considerar el valor de la constante de afinidad. La constante de afinidad de la SBP humana con respecto a la DHT es aproximadamente dos órdenes más alta que la correspondiente a la baSBP (0,4-1.6/nM vs 0,04-0,07/nM) (212). Como las constantes de disociación son similares (baSBP= 1,14-1.44/min vs hSBP= 0,9/min) (210) la diferencia entre ambas puede atribuirse a una menor constante de velocidad de asociación. Suponiendo que la asociación sea una reacción bimolecular, a igual concentración de ligando puede obtenerse una misma velocidad de asociación, aumentando tanto la constante de velocidad de asociación como la concentración de SBP. Es posible entonces que el *E. arenaarum* compense la menor constante de velocidad de asociación aumentando la concentración de proteína transportadora.

Los gráficos de Scatchard obtenidos con la baSBP fueron curvilíneos. Esto no ha sido descrito para otras especies, pero es muy posible que la unión de baja afinidad haya sido considerada inespecífica y descartada como tal, transformando en consecuencia a los gráficos en rectas. También es posible que el segundo sitio se deba a un artificio de la técnica de separación. Mediante

simulaciones se demostró que esto es factible siempre que la concentración de carbón sea suficientemente baja. Con una concentración de carbón equivalente a 20 nM la aparición de un segundo sitio es posible, pero no con una concentración equivalente a 100 nM. Sin embargo, una concentración de carbón de 100 nM es la que proporciona, por simulación, un valor de "blanco" equivalente al obtenido experimentalmente, mientras que con una concentración de 20 nM se obtiene un valor de "blanco" mucho más alto que el experimental. En consecuencia, las simulaciones indican que en las condiciones experimentales utilizadas, es poco probable que el segundo sitio se deba a un artificio de la técnica.

Los resultados obtenidos con geles de poliacrilamida, en condiciones de estado estacionario, indican que la SBP es la única proteína con capacidad de unir DHT. Además, de los resultados indicados en el cuadro de purificación, puede deducirse que el número de sitios de unión (a saturación) es de 1,8 por molécula de proteína. Considerando que la proteína pudo haberse dañado en parte durante la purificación, puede asumirse que el número de sitios de unión por molécula es de 2. En consecuencia, la baSBP se comporta como una proteína con dos sitios de unión

y dado que los gráficos de Scatchard obtenidos fueron curvilíneos, estos sitios podrían tener distintas constantes de afinidad o presentar cooperatividad negativa.

Con una concentración de DHT igual a la usada en la determinación de la constante de velocidad de disociación ($2 \mu\text{M}$), por agregado de un exceso de ligando no radiactivo, el tiempo requerido para llegar a un 90% del valor de equilibrio es de aproximadamente 1 segundo. Por lo tanto, durante la determinación de dicha constante, el ligando llega al equilibrio mucho antes de agregar el carbón (15 seg. para el primer punto). Si existiese cooperatividad negativa, el valor obtenido al determinar la constante de velocidad de disociación, adsorbiendo el esteroide libre con exceso de carbón, debería ser mucho menor que el obtenido con exceso de DHT. Como los resultados dieron valores similares para la constante de velocidad de disociación por ambos métodos, éstos no concuerdan con un modelo de cooperatividad negativa. En consecuencia, el modelo más adecuado podría ser el de una proteína con dos sitios de unión, de distintas afinidades e independientes entre sí. Por este motivo se realizó también una simulación para un modelo de dos sitios independientes.

Sin embargo, las simulaciones realizadas con un modelo de sitio único y las realizadas con un modelo de dos sitios, indican que en las condiciones experimentales usadas debería existir subestimación en la constante de afinidad y en la máxima capacidad de unión. No obstante, en las separaciones del esteroide libre mediante electroforesis, pudo verse que con DHT no existe tal subestimación. Por lo tanto, en las separaciones con carbón el sistema se comporta como si la constante de velocidad de disociación fuese menor que la medida experimentalmente. Una posible explicación para la falta de concordancia entre los resultados experimentales y los modelos utilizados en las simulaciones, es que el modelo cinético sea más complejo que una simple reacción bimolecular reversible y que de alguna manera, la constante de velocidad de disociación sea menor en las condiciones en que se determina la constante de afinidad ($K=140$ nM), que en las usadas para la determinación de la constante de velocidad de disociación ($K=1$ nM).

Con testosterona y estradiol la situación es distinta. Al tener estos esteroides una menor constante de afinidad, la subestimación en la máxima capacidad de unión debe ser mayor y esto se nota claramente al comparar los resultados

obtenidos: el esteroide de menor constante de afinidad (E2) es el que muestra menor número (aparente) de sitios de unión. Este resultado también podría obtenerse si los ligandos se uniesen a sitios distintos, pero no existe ninguna evidencia experimental en favor de este hecho. En realidad, tanto la testosterona como el estradiol pueden desplazar a la DHT, y la DHT y la testosterona al estradiol y por lo tanto, se asume que la diferencia en el número de sitios ocurre por poseer estos esteroides una mayor constante de velocidad de disociación que la DHT. De todo modos, en los ensayos de caracterización se utilizó DHT para evitar subestimaciones en la máxima capacidad de unión (con excepción de los ensayos de especificidad donde además se usó estradiol).

Los resultados de las incubaciones con distintos competidores indican que la baSBP tiene una alta especificidad por DHT, testosterona y estradiol. Los estrógenos sintéticos, la progesterona y el cortisol, fueron capaces de competir con DHT ni con estradiol, a excepción del R1881, el cual no se une a la hSBP (213) pero sí a la baSBP. Quizás la proteína del Bufo arenarum sea algo menos específica que la SBP humana. Este resultado deberá tenerse en cuenta si se desean determinar receptores

de andrógenos en anfibios.

Durante la desnaturalización térmica y a diferencia de la desnaturalización por ácidos o álcalis, las proteínas quedan en estado anfótero y no se produce un desplegamiento o expansión de las cadenas por repulsión electrostática, sino que los enlaces intracatenarios se disocian por causa del movimiento térmico de las cadenas polipeptídicas. Mientras las proteínas se encuentran en equilibrio entre distintas conformaciones se establecen nuevos enlaces (puentes de hidrógeno, hidrofóbicos etc.) y al enfriar la solución puede ser que la proteína alcance nuevamente su conformación nativa o no, dependiendo de la reversibilidad de las transiciones entre las distintas conformaciones.

En general, las proteínas que conservan intactos los enlaces -S-S- sufren una desnaturalización térmica reversible (214). Los resultados obtenidos durante la desnaturalización térmica de la baSBP indican que, luego de ser expuesta a temperaturas superiores a los 40 °C durante 2 hs, no es posible recuperar la actividad original manteniéndola a 4 °C durante el mismo tiempo. Los resultados también indican que la pérdida de actividad es totalmente irreversible por sobre los 60 °C, al menos

durante un período de incubación igual al de exposición a las distintas temperaturas.

Dado que la baSBP contiene por lo menos un residuo de cisteína y un puente disulfuro directamente relacionados con la actividad (ver más adelante), es muy probable que la pérdida irreversible de actividad durante la desnaturalización térmica se deba a la formación y ruptura de nuevos enlaces -S-S- por intercambio. En este aspecto, el comportamiento de la baSBP es muy similar al descrito por Vermeulen y Verdonck (212) para la proteína humana, la cual es estable hasta los 45 °C pero totalmente destruida por calentamiento durante 1 hora a 57 °C.

Se conoce desde hace algún tiempo que la afinidad entre los esteroides y las proteínas transportadoras es dependiente del pH (47), con un valor máximo en la región neutra o alcalina. A bajas concentraciones de DHT (1 nM) la baSBP tiene máxima actividad entre pH 7 y 9. Dentro del rango 5-10 el efecto del pH es reversible. Fuera de este rango la pérdida de actividad es irreversible y más pronunciada cuanto más alejado se encuentra el pH de la neutralidad. Comparando estos resultados con los obtenidos con una concentración de ligando saturante para el sitio de

mayor afinidad, puede notarse que en este último caso no hay variación en la actividad entre pH 5 y 11. Aparentemente el ligando tiene un efecto protector frente a un pH alcalino.

En la zona ácida, el comportamiento es similar para ambas concentraciones. La pérdida de actividad en la zona ácida podría deberse a la asociación de un H^+ al grupo imidazol de una histidina ($pK = 6,1$). Es evidente, sin embargo, que la protonación del grupo imidazol no puede ser la única causa de la pérdida de actividad porque ésta es irreversible por debajo de pH 4.

Cuando la proteína fue mantenida durante 7 días a -20 °C, se notó pérdida de actividad tanto en la zona ácida como en la alcalina. Fuera del intervalo 7-8 la pérdida de actividad fue muy notoria. Por este motivo se consideró un pH de 7,4 como óptimo para almacenar la proteína y para mantener la actividad durante las incubaciones. Distintos aminoácidos pueden estar involucrados en una pérdida de actividad en medio alcalino (tirosina, $pK(-OH) = 10,1$; arginina, $pK(\text{guanidilo}) = 10,8$; lisina, $pK(\epsilon-NH_2) = 10,5$). Sin embargo, la pérdida irreversible de actividad en esta zona se hace evidente luego de 7 días a -20 °C y no a

tiempos cortos (2 hs). Teniendo en cuenta que el equilibrio



se desplaza hacia la derecha en soluciones alcalinas y que al menos un grupo -SH está directamente relacionado con la unión del esteroide o con el mantenimiento de una conformación adecuada (ver más adelante), es posible entonces que el daño producido en medio alcalino se deba a la oxidación del grupo -SH producida por el oxígeno atmosférico. De todos modos, es posible, aunque poco probable, que alguno de los aminoácidos antes mencionados también esté relacionado en alguna medida con la unión.

En un ensayo preliminar para comprobar si era necesario un grupo -SH para la actividad de la baSBP, se estudió el efecto de diversos cationes divalentes. Los resultados mostraron que el Cd^{2+} y el Hg^{2+} inhiben a la baSBP. El poder inhibitorio de estos iones concuerda con su reactividad frente a los grupos -SH. Los otros iones, que no son reactivos frente a sulfhidrilos, no produjeron modificaciones en la actividad.

Los resultados anteriores (temp., pH y cationes), sugerían que un residuo -SH y un enlace -S-S- estaban relacionados con la unión. Para comprobar esta hipótesis se realizaron incubaciones en presencia de 2-mercaptoetanol y de N-etilmaleimida. Estos ensayos indicaron que efectivamente, por lo menos un residuo de cisteína y un puente disulfuro están directamente relacionados con la actividad de la baSBP. Asimismo, ambos resultados coinciden con los obtenidos por Pearlman y col.(170) con la SBP humana.

Con el fin de determinar si el ligando era capaz de proteger al sitio de unión frente a estos reactivos, se analizaron sus efectos mediante gráficos de Scatchard. Ambos compuestos producen una disminución en la constante de mayor afinidad sin modificar el número de sitios de unión. El sitio de menor afinidad no se vió afectado con las concentraciones usadas en estos ensayos. Por lo tanto, dado que el número de sitios de unión no se modificó, los resultados sugieren un efecto protector del ligando frente a estos reactivos.

La modificación en la pendiente puede deberse a dos causas distintas. En primer lugar, los inhibidores pueden producir una modificación real en la constante de afinidad, alterando la conformación de la proteína por un efecto a distancia o alterando el sitio de unión. En segundo lugar, una inhibición competitiva produciría los mismos resultados, es decir, el esteroide al unirse a sus sitios de anclaje impediría que los inhibidores reaccionen con ellos, actuando en consecuencia como competidor.

Comparando entre sí los gráficos de Scatchard obtenidos en la determinación de la constante de afinidad de DHT, T y E2, puede verse que una variación en la constante de afinidad produce invariablemente una subestimación en la máxima capacidad de unión. Como se vió, este comportamiento constituye una característica propia del sistema de separación. En consecuencia, si existiese realmente una modificación en la constante de afinidad, debería modificarse también la máxima capacidad de unión. Como esto no ocurre, se asume que la unión de los esteroides y de los inhibidores a la baSBP es competitiva, en el sentido de que la unión de uno impide la unión del otro.

La afirmación anterior de ninguna manera implica que la unión de los inhibidores ocurra en el mismo sitio que la unión del esteroide, ya que también el efecto protector del esteroide puede ejercerse por acción a distancia. Sin embargo esto último es menos probable. En consecuencia, posiblemente estos inhibidores actúen en el sitio de unión del esteroide o en un sitio muy cercano. Con la SBP humana no se han realizado estudios similares pero sí con la transcortina. Los resultados obtenidos por el grupo de Westphal (47) con dicha proteína, son equivalentes a los obtenidos con la baSBP: el 2-mercaptoetanol también modifica la constante de afinidad sin modificar la máxima capacidad de unión.

Los resultados obtenidos con la baSBP con respecto a la temperatura, pH, reductores y bloqueantes de sulfhidrilos son muy similares a los descritos para la transcortina. En la figura 31 se muestra la estructura propuesta para dicha proteína por Dafay col. (215), basándose en estudios de resonancia electrónica de spin.

En el sitio de unión existe un residuo de histidina y uno de cisteína. Ya se discutió la posibilidad de que un residuo de histidina y uno de cisteína estuviesen

involucrados en el sitio de unión de la baSBP. Quizás estas proteínas hayan derivado de un gen antecesor común, manteniendo una estructura similar en el sitio de unión, aunque no en el resto de la proteína dado que el peso molecular es diferente (216). En la SBP humana se ha descrito también la importancia de un residuo de cisteína y de un enlace disulfuro (170). Asimismo coincide el rango de estabilidad frente al pH y temperatura (217,212).

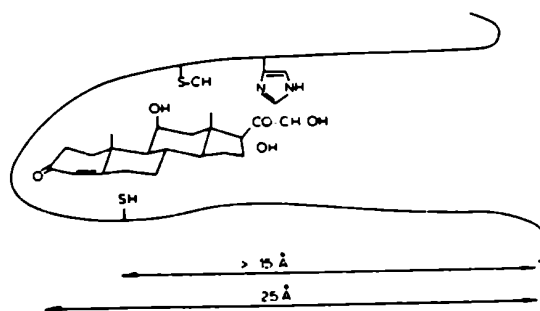


Figura 31: estructura del sitio de unión en la CBG.

Rosner y col (218) han demostrado que el ión Ca^{2+} ejerce un efecto protector sobre la actividad de la hSBP. Además, Suzuki y col (167) demostraron que la SBP bovina se separa en subunidades por tratamiento con EGTA. Se estudió entonces el efecto del EGTA sobre la actividad de la baSBP. La incubación en presencia de EGTA durante 6 días produjo una caída del 85% en la actividad y esta pérdida fue sólo

parcialmente reversible luego de 24 hs en presencia de Ca^{2+} (aumentó del 15 al 40%). Con tiempos de incubación cortos (2 hs) la pérdida de actividad fue similar, pero la recuperación total. Sin embargo, los resultados obtenidos con tiempos de incubación cortos fueron muy poco reproducibles; en muchos casos el EGTA no tuvo efecto alguno. Como se discutirá posteriormente, el EGTA aumenta en gran medida la sensibilidad de la baSBP frente a la oxidación y quizás la presencia de diferentes cantidades de oxígeno en el buffer de incubación, sea responsable del efecto observado y de la falta de reproducibilidad.

Para estudiar el efecto de un oxidante sobre la actividad de la baSBP, se realizaron incubaciones en presencia de peróxido de hidrógeno. Con este oxidante a una concentración de 60 mM se produjo un 50% de reducción en la actividad de la baSBP. Este resultado deberá tenerse en cuenta si se intenta una marcación de la proteína con lactoperoxidasa y ^{125}I . Con el fin de ver si el Ca^{2+} era capaz de proteger a la proteína de la oxidación, se realizaron incubaciones en presencia del oxidante, EGTA y Ca^{2+} . Los resultados mostraron que dicho ión protege a la proteína frente a la oxidación con peróxido de hidrógeno y en consecuencia, posiblemente el Ca^{2+} ejerce su efecto

protector durante la purificación o el almacenamiento impidiendo la oxidación de la proteína por el oxígeno atmosférico. Por otro lado, el EGTA aumenta la labilidad de la proteína frente al oxidante. Según Suzuki y col. (167) el EGTA induce la disociación de las subunidades de la SBP bovina y este efecto es revertido por el Ca^{2+} . Es posible que la baSBP también se disocie en subunidades en ausencia de dicho ión, y que éstas sean más fácilmente oxidables que la proteína nativa.

En cuanto al efecto protector del Ca^{2+} debe tenerse en cuenta otro aspecto. Dado que el Sr^{2+} , Ba^{2+} y Mg^{2+} protegen en menor medida a la baSBP (estos resultados no se muestran), el efecto del Ca^{2+} es bastante específico. Sin embargo, este efecto protector es máximo a una concentración de 50 mM (218). Por lo tanto, no es probable que exista un sitio de unión específico para el Ca^{2+} en la SBP. Quizás éste actúe uniéndose al carboxilato de los ácidos glutámico, aspártico y siálico, ayudando a mantener una conformación óptima para la estabilidad. Es importante considerar que la SBP se encuentra en un medio donde las concentraciones de Ca^{2+} y oxígeno son relativamente constantes y que la proteína debe estar adaptada a este medio. Aparentemente existiría un equilibrio muy delicado entre los sulfhidrilos, los puentes

disulfuro, la concentración de Ca^{2+} y de oxígeno. Se comprende así que la SBP sea muy lábil fuera de su ambiente natural.

En vista de los resultados obtenidos, es conveniente mantener a esta proteína a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pH 7,4 y en presencia de una concentración saturante de ligando. No deben usarse reductores ni complejantes del Ca^{2+} . Por otro lado, los resultados obtenidos al congelar la proteína indican que no es necesario el agregado de glicerol y que la actividad no se afecta por 5 congelamientos sucesivos.

Los resultados obtenidos durante la determinación del coeficiente de sedimentación y del radio de Stokes, se usaron para determinar el peso molecular, el radio de una esfera equivalente, el coeficiente friccional (f/f_0) y la relación entre el radio axial y el radio ecuatorial, considerando a la proteína deshidratada. Los valores obtenidos para los distintos parámetros son muy similares a los descritos para la SBP humana y la bovina. En la tabla XIII se muestra un cuadro comparativo.

Aparentemente la proteína humana es más asimétrica o está más hidratada que la SBP de *B. arenarum*. Esto puede ser el reflejo de una composición diferente de hidratos de

carbono, en particular de ácido siálico. Sin embargo, los valores descriptos por los diversos autores no contienen los errores y no es posible saber si las diferencias son significativas.

Tabla XIII: Cuadro comparativo de algunas características físico-químicas

	baSBP	hSBP (a)	bSBP (b)
S 20,w (S)	5,2	4,6	5,3
Rs (A)	43,5	47,0	41,8
M/1000	93,3	90,0	89,5
f/fo	1,45	1,59	1,42
re	29,9	29,6	29,4

a: An-Fei Hsu y P. Troen (219).

b: Suzuki y col. (167)

Luego de la caracterización de la baSBP sérica, el trabajo fue orientado hacia la purificación de la proteína. Como la SBP necesita que el esteroide tenga un grupo hidroxilo libre en posición 17 con orientación beta y una función oxigenada en posición 3, se intentó en primer lugar la síntesis de un derivado con estas características. Para ello se utilizaron reacciones de adición al carbonilo (C-17) de la androsterona. Como se indicó en los resultados todos los intentos fueron infructuosos debido a que las reacciones secundarias (enolización y reducción)

eran mayoritarias. Desafortunadamente, los autores que describieron este tipo de reacciones con esteroides (220), no indicaron en sus resultados ni la presencia de estas reacciones secundarias ni el rendimiento obtenido.

Las reacciones de adición al carbonilo en C-17, mediante reactivos de Grignard o sales de alquinos, son más dificultosas cuanto más larga es la cadena carbonada del compuesto involucrado en la reacción. Así, un metilo puede unirse sin que se produzcan reacciones secundarias, mientras que un etilo ya presenta algo de reducción como reacción secundaria (221) y la adición de un propilo es muy ineficiente (222). Es lógico entonces, que la adición al carbonilo dé preponderantemente reacciones secundarias, cuando la cadena es de 5 o más carbonos.

Para mejorar el rendimiento se podrían haber intentado algunas modificaciones adicionales en la reacción, pero como el éxito era poco probable se prefirió otra alternativa. Dado que la proteína necesita fundamentalmente un hidroxilo en C-17(beta), podía intentarse la formación de un éster con un hidroxilo en C-3. Se realizó entonces la síntesis de hemisuccinato de epiandrosterona y luego se redujo el carbonilo en C-17 a

hidroxilo para obtener hemisuccinato de 3β -, 17β -androstanodiol. Esta síntesis no presentó dificultades.

Como se mencionó en la introducción, los ésteres en C-3 nunca habían resultado útiles por motivos no muy claros. Pero como la baSBP tenía una afinidad menor que la SBP humana parecía más apropiado mantener libre el hidroxilo en C-17 y no en C-3, dado que el primero es fundamental para la unión. Al principio, tal como había sido descrito por otros autores (164) no se pudo obtener unión de la baSBP con dicho esteroide acoplado a la matriz de Sepharosa. Posteriormente pudo comprobarse que la baSBP no se unía a la columna, debido a la presencia de un competidor en el gel. Muy probablemente éste sea esteroide que no fue totalmente eliminado durante los lavados o esteroide hidrolizado por acción química, o por esterases séricas. El acetato de 3β -, 17β -androstenodiol es más fácilmente hidrolizable en posición 3β que en 17β (223) y por lo tanto, una mayor hidrólisis química de los derivados en C-3 constituye una hipótesis razonable para que los ligandos con ésteres en C-17 hayan sido más efectivos que los ligandos con ésteres en C-3.

En cuanto a la purificación, el primer paso utilizado fue la precipitación con sulfato de amonio. Como el Ca^{2+} es necesario para mantener la estabilidad de la proteína, el precipitado se resuspendió en un buffer con CaCl_2 (50 mM). A esta concentración el Ca^{2+} produce la precipitación de algunas proteínas del suero (esto no ocurre con el suero humano o de conejo), por lo tanto, se dejó la solución durante 6 hs con agitación constante y luego se centrifugó, descartándose el precipitado. El rendimiento de estas dos etapas en conjunto fue del 76%, eliminándose aproximadamente un 50% de proteínas.

El paso siguiente fue la purificación por cromatografía de afinidad. Teniendo en cuenta las causas posibles de la presencia del competidor y la dificultad que originaba éste en la purificación, se utilizaron dos estrategias distintas para eliminarlo del sistema de separación. En primer lugar, se agregó una columna de carbón (adsorbido sobre Sepharosa) en serie con la de afinidad, con el fin de eliminar por reciclado todo el esteroide libre que pudiese estar presente. En segundo lugar, para disminuir la posibilidad de hidrólisis (química o enzimática) durante el reciclaje, y aumentar la probabilidad de asociación de la baSBP, se colocó la

columna de afinidad a 0-4 °C mientras que la columna de carbón era mantenida a temperatura ambiente, con el fin de facilitar la disociación del esteroide que se hubiese unido a la proteína transportadora. De esta forma pudo conseguirse una unión altamente eficiente de la baSBP a la columna de afinidad y esto posibilitó su posterior purificación por electroforesis preparativa sin mayores dificultades.

Cabe destacar que a pesar de ser tanto la constante de afinidad como el ligando unido a la matriz netamente desfavorables para la unión, el rendimiento obtenido en esta etapa fue muy bueno (55%). El método de reciclado descrito puede ser de utilidad general para aumentar el rendimiento de las columnas de afinidad, dado que el lavado ineficiente y la hidrólisis del ligando son dificultades frecuentes en cromatografía de afinidad. Posiblemente por este motivo, los rendimientos obtenidos con la SBP humana no hayan sido más altos, a pesar de tener esta proteína una mayor constante de afinidad.

El paso siguiente fue la electroforesis preparativa que se realizó utilizando todas las fracciones eluidas con DHT. Durante la preparación de este gel y del utilizado

para la electroelución, todas las soluciones contenían un exceso de DHT con el fin de proteger a la proteína. Los resultados obtenidos con geles nativos indicaron la presencia de una única banda luego de la última etapa de purificación. Utilizando distintas concentraciones de acrilamida (4-10%) no pudieron detectarse bandas adicionales. Por otro lado, en la muestra de suero no pudo distinguirse ninguna banda en la región de baSBP, pero en el gel correspondiente al eluido se notó claramente su presencia debido a que la proteína había sido previamente concentrada por la columna de afinidad.

Tabla XIV: Rendimientos obtenidos en la purificación de SBP por diversos autores

Autor y año	F	R%
Mickelson (164) 1970	C-3	4
Rosner (165) 1975	C-17	35
Suzuki (167) 1977	C-3, C-17	5
Petra (168) 1978	C-3	34
Petra (169) 1980	C-3, C-17	60
Este trabajo (baSBP)	C-17	36

F= posición de la función libre.

El rendimiento conjunto de estas etapas fue del 86% y el rendimiento final obtenido en la purificación fue del 36%. Esto indica que el método de purificación es adecuado para obtener suficiente cantidad de SBP como para emprender

estudios bioquímicos y fisiológicos. En la tabla XIV se muestra el rendimiento final obtenido por diversos autores con la hSBP.

Para confirmar la pureza de la baSBP y determinar si existían subunidades, se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes. En primer lugar se utilizó el método de Laemmli (192), realizándose corridas a dos voltajes distintos (100 y 200 voltios). Los resultados a 200 voltios muestran la presencia de microheterogeneidad. Esto se hace evidente al considerar los resultados a 100 voltios donde el número de bandas se reduce de 5 a 2.

La microheterogeneidad de una proteína puede atribuirse a diversas causas (224):

- Las distintas bandas pueden representar diversos subestados conformacionales estables.
- Interacción entre las subunidades.
- Distribución no uniforme de los hidratos de carbono (en particular ácido siálico).

Diferentes grados de fosforilación, metilación, acetilación, etc.

Desaminación parcial de los residuos de asparagina o glutamina.

- Diferentes estados redox de los residuos de cisteína.
- Polimorfismo de origen genético.

En general, la microheterogeneidad se hace evidente al usar isoelectroenfoque. Con SDS la probabilidad de interacciones entre subunidades es mínima. Por otro lado, las diferencias en carga neta, originadas por distinto grado de fosforilación, deaminación, contenido de ácido siálico, etc. quedan solapadas por la alta densidad de cargas aportadas por el SDS. Además, el 2-mercaptoetanol prácticamente elimina la posibilidad de existencia de distintos estados redox en los residuos de cisteína. Por estos motivos, y debido a que el SDS se une en una cantidad constante por longitud de cadena, se cumplen las dos condiciones fundamentales para la determinación del peso molecular con este método: igual densidad de carga y conformación entre la proteína incógnita y los patrones.

La mayoría de las proteínas cumplen con estos requisitos, sin embargo hay excepciones (225, 226, 227, 228, 229):

- ciertas glicoproteínas y lipoproteínas unen diferente cantidad de SDS que los patrones y por lo tanto difiere la densidad de carga con respecto a los patrones.
- en algunas proteínas las cargas intrínsecas no son completamente enmascaradas por las cargas negativas de la moléculas de SDS.
- existen proteínas que son resistentes a la desnaturalización con SDS y asumen conformaciones atípicas.

En el caso de la baSBP, la microheterogeneidad disminuye al disminuir el voltaje y desaparece totalmente si además se aumenta la fuerza iónica. Por otra parte, al disminuir el voltaje, los valores de Rf se "promedian". Este comportamiento es difícilmente explicable por diferencias en las cargas intrínsecas, menor contenido de SDS, daño proteolítico, o algunas de las causas antes mencionadas que afecten las cargas intrínsecas. Es posible que las bandas representen distintos subestados conformacionales en equilibrio. Así, al disminuir la velocidad de migración (por disminución del voltaje y/o la fuerza iónica) hasta un valor inferior a la vida media de los distintos subestados conformacionales se notaría únicamente el valor promedio.

Debería tenerse sumo cuidado al caracterizar el peso molecular de glicoproteínas con estos métodos. Sin embargo, es indudable que pueden ser útiles con fines comparativos, siempre que las electroforesis de las proteínas que se quieran comparar se lleven a cabo en las mismas condiciones. Teniendo en cuenta esto, se realizó una electroforesis siguiendo el método de Weber y Osborn, utilizado en la determinación del peso molecular de la SBP humana por el grupo de Petra (159).

El método de Weber y Osborn tiene dos características que atenúan los efectos de las cargas intrínsecas. En primer lugar, la fuerza iónica del buffer de separación es mayor, con lo cual la carga neta es menor. En segundo lugar, el pH es menor y en consecuencia las cargas intrínsecas están más neutralizadas. Además la velocidad de migración es menor, de modo que si existen distintos subestados conformacionales, éstos pueden estar promediados. Los resultados obtenidos indican la presencia de una única banda de peso molecular 52,6 K. Este resultado es muy semejante al obtenido por Petra y col (159) para la SBP humana (52K). Suponiendo que el error debido al comportamiento anómalo no fuese muy grande, la baSBP debería tener dos subunidades (o tres). Por otro

lado, cuando las muestras no fueron tratadas con 2-mercaptoetanol, el peso molecular obtenido fue el mismo, indicando este resultado que las subunidades no están unidas por puentes disulfuro.

En la proteína humana también se ha observado microheterogeneidad, aunque en forma menos notoria (159). Como la microheterogeneidad no parece ser producto de diferencias en el peso molecular y tanto en geles nativos de distintas concentraciones de acrilamida, como en geles desnaturalizantes (Weber y Osborn), no pudieron detectarse bandas adicionales, se asume que la proteína ha sido purificada a homogeneidad.

La SBP de B. arenarum se une cuantitativamente a concanavalina-A. Es posible entonces que esta proteína tenga manosas terminales, pero esto deberá ser comprobado. La SBP humana también se une cuantitativamente a esta lectina, mientras que no lo hace así la proteína que transporta testosterona (ABP) desde el testículo hacia el epidídimo (219). Esto constituye otra característica en común entre la baSBP y la hSBP.

Con el fin de disponer de un método sensible y no destructivo para conocer la concentración de la baSBP, se determinó su absorptividad a 205 nm. El valor obtenido fue algo mayor que el valor promedio en proteínas ($E(205, \text{mg/ml}) = 33,2$ y 31 respectivamente) (173). De esta forma, la concentración de una muestra de SBP pura dió un valor muy semejante al obtenido con el método de Lowry ($11,8 \text{ ug/ml}$ y $11,0$ respectivamente) y la absorptividad a 280 nm para una concentración 1% (p/v) fue de $E(280, 1\%) = 16,9 \pm 0,3$ (sd, n=2), obteniéndose una relación $A_{280}/A_{260} = 1,20 \pm 0,02$ (sd, n=2). El valor $E(280, 1\%)$ obtenido por Petra y col. para la hSPB fue de $15,5$ (230). Como la absorbancia a 205 nm depende de la unión amida y se realiza una corrección por la absorbancia a 280 nm, en el caso de proteínas puras este método (173) está sujeto a mucho menos error (<2%) que el método de Lowry (178) y por este motivo se lo usó en la determinación de la concentración de la muestra destinada al análisis de la composición de aminoácidos.

Dado que la composición de hidratos de carbono de la baSBP no fue determinada, con el fin de comparar los resultados del análisis de aminoácidos con los obtenidos con la proteína humana, los valores obtenidos fueron

normalizados como se indicó anteriormente. Aunque las diferencias fueron significativas (chi-cuadrado, $p < 0,01$), existe una gran similitud entre ambas proteínas. Las diferencias más importantes, en cuanto al test de chi-cuadrado, se muestran en la tabla XV en orden decreciente.

Tabla XV: Diferencias más significativas entre la composición de aminoácidos de baSBP y hSBP.

AA	n°	[baSBP/hSBP]	(V-Vt)/Vt
Valina	11	1,6	17,2
Tirosina	15	1,9	7,7
Glicina	9	0,7	6,8
Prolina	8	0,6	6,4
Aspártico	4	1,2	5,0

n°= número correspondiente en la tabla IX
[baSBP/hSBP]= relación de concentraciones.
(V-Vt)/Vt= contribución al chi-cuadrado.

La composición total del resto de los aminoácidos no difiere significativamente de la encontrada en la hSBP. Como la glicina es un contaminante muy común y la tirosina se encuentra en una concentración muy baja, ambos aminoácidos están sujetos a mayor error. Por estos motivos las diferencias más importantes están dadas por el mayor contenido de valina y el menor contenido de prolina con respecto a la hSBP. De todos modos, la similitud entre ambas proteínas es notable y teniendo en cuenta que los

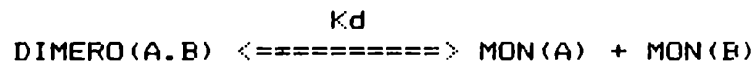
anfibios están muy alejados en la escala zoológica, es indudable que la evolución de la SBP ha sido altamente conservativa.

Todas las características físico-químicas y propiedades de la baSBP estudiadas en el presente trabajo indican que esta proteína y la hSBP son muy semejantes y que probablemente, además de tener una estructura similar, cumplan el mismo rol fisiológico. Las únicas diferencias notables son la menor constante de afinidad y la menor especificidad que posee la baSBP en relación con la SBP humana, teniendo en cuenta que la baSBP une R1881 mientras que la proteína humana no.

Como conclusión de los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de la proteína transportadora de esteroides sexuales en Bufo arenarum, se postula un modelo que permite explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo y algunos obtenidos por otros autores. El modelo, cuyo esquema se muestra en la figura 32, es el siguiente:

- La baSBP está compuesta por dos (tres) subunidades (A y B), no unidas por puentes disulfuro.

- El esteroide se coloca entre las subunidades contribuyendo ambas a la unión mediante sitios de anclaje distintos; una subunidad se une al esteroide del mismo lado del plano ecuatorial que los metilos angulares y la otra subunidad del lado opuesto. La interacción entre las subunidades es tanto mayor cuanto más plano es el ligando.
- Las subunidades pueden disociarse debido a que no están unidas por puentes disulfuro y por lo tanto se cumple el siguiente equilibrio:



Si la concentración de la proteína es menor que K_d , el equilibrio estará desplazado hacia la derecha.

- La proteína se encuentra en el suero en una concentración tal que predomina el dímero y es ésta la única forma fisiológicamente activa.

El ligando puede asociarse a los monómeros pero la constante de velocidad de disociación de éstos es mayor que la del dímero, ya que teniendo menos sitios de anclaje, la probabilidad de disociación es mayor.

- La constante de velocidad de disociación del monómero A es similar a la del monómero B.

- Tal como ocurre con otras proteínas (231), el ligando puede inducir la asociación de los monómeros. Esta asociación tiene un valor máximo cuando la relación ligando/dímero es de 1:1. Un exceso de ligando produce el efecto contrario, dado que el esteroide no puede servir de nexo entre las subunidades, sino que más bien contribuye a disociarlas.

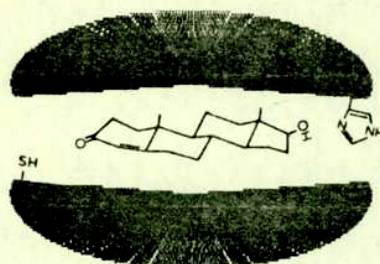


Figura 32: representación hipotética de la baSBP.

Anteriormente se mencionó que la baSBP se comportaba en el sistema de separación con carbón como si la constante de velocidad de disociación fuese menor que la medida experimentalmente. Teniendo en cuenta las premisas anteriores, la constante de velocidad de disociación que se obtendría usando una dilución de suero suficientemente alta

o en presencia de un exceso de ligando, correspondería a la constante de velocidad de disociación de los monómeros. Como en las condiciones en que se determina la constante de afinidad, la baSBP se encuentra 140 veces más concentrada, la probabilidad de que se encuentre como dímero es mucho mayor y por lo tanto, la constante de velocidad de disociación que corresponde es la del dímero y no la de los monómeros. Esto explica que en las condiciones en que se determina la constante de afinidad, la proteína se comporte como si la constante de velocidad de disociación fuese menor que la determinada experimentalmente. Asimismo, el modelo justifica la aparición de un sitio de menor afinidad cuando la concentración de ligando es suficientemente alta (monómeros) y que el número de sitios medidos a saturación sea de 2 por molécula.

El modelo permite también explicar los resultados obtenidos por Strel'chyonok y col (232) al estudiar la unión de SBP a membranas de endometrio humano. Los autores observaron que, a bajas concentraciones de estradiol, la afinidad de la proteína por su receptor era menor que cuando la relación entre el estradiol y la SBP era de 1:1. Por otra parte, cuando la concentración de estradiol estaba por encima de esta relación, la afinidad disminuía

nuevamente. Si suponemos que la proteína se encuentra en condiciones fisiológicas como dímero, es lógico suponer que el receptor reconozca fundamentalmente al dímero. Pero como la concentración utilizada normalmente en la determinación de receptores es sumamente baja, podemos asumir que el equilibrio pueda estar desplazado en parte hacia los monómeros. Así, al aumentar la concentración de ligando el equilibrio puede desplazarse en uno u otro sentido, según cual sea la concentración de ligando, y dar el comportamiento observado por los mencionados autores.

El modelo también concuerda con la necesidad de una estructura plana en el ligando (233). Cuanto menor sea el volumen ocupado por el ligando, mayor probabilidad de interacción entre las subunidades existirá y por lo tanto, menor probabilidad de disociación y mayor constante de afinidad.

Finalmente, en lo concerniente a la regulación hormonal de la baSBP, es de hacer notar que a mayor contenido endógeno de estradiol, mayor fue la concentración de proteína transportadora encontrada en el suero del Bufo arenarum. En todos los casos la máxima capacidad de unión fue superior al contenido de estradiol (entre 10 y 1000

veces). Por otro lado, cuando animales normales fueron inyectados con estradiol, en el término de 24 hs la baSBP aumentó casi 5 veces, alcanzando un valor máximo de 5 uM. Este valor se mantuvo constante durante el resto del tratamiento (9 días), indicando que posiblemente ésta es la máxima concentración sérica que puede alcanzar. De alguna forma el estradiol aumenta el contenido de SBP y en este sentido los resultados coinciden con los obtenidos en humanos (149).

Los animales ovariectomizados, luego de 7 días de operados, disminuyeron muy poco la concentración de baSBP, aunque esta disminución fue significativa. El contenido de estradiol en este caso disminuyó 6 veces. Contrariamente a lo esperado, en los animales ovariectomizados y tratados con estradiol la baSBP disminuyó casi 4 veces a pesar de que el contenido de estradiol aumentó 3 veces debido a las inyecciones. Los resultados sugieren que el tratamiento con estradiol induce un aumento en la degradación de la proteína o una disminución en la biosíntesis. Sin embargo, estos resultados son difíciles de conciliar con los obtenidos en los animales intactos, donde el estradiol aumenta el contenido de baSBP.

Suzuki y Sinhoara (160) demostraron la presencia de receptores hepáticos para la asialo-SBP bovina. La menor concentración de baSBP en los animales ovariectomizados y tratados con estradiol, podría deberse a un aumento de estos receptores y por lo tanto de la degradación de la proteína. (asumiendo que la degradación de la proteína con sus residuos de ácido siálico intactos también ocurra en el hígado). De todos modos, no queda claro por qué en los animales normales este efecto no se manifiesta. Se podría postular que en esta especie la proteína es sintetizada en parte en el hígado (como aparentemente ocurre en el humano (158)) y en parte en el ovario. Al inyectar con estradiol, los animales normales aumentarían sus receptores hepáticos pero también la biosíntesis en ovarios y hepatocitos, dando como resultado un balance neto positivo. Por el contrario, al ovariectomizar los animales, el balance neto sería negativo.

Para probar esta hipótesis se necesita demostrar la presencia de receptores para la baSBP en el hígado y su regulación por estradiol. Por otro lado, se necesita demostrar que la baSBP puede ser sintetizada en el ovario. Con este fin se realizaron las incubaciones antes descritas, pero no pudo detectarse biosíntesis de SBP ni

en hepatocitos aislados, ni en incubaciones de tejido hepático u ovárico. Como la detección se realizó midiendo la actividad de SBP en el medio de incubación y dado que esta proteína es muy lábil, es posible que la misma se destruya por el oxígeno atmosférico antes de ser medida. También es posible que requiera algún estímulo hormonal aparte del ejercido por el estradiol. Sin duda, la obtención de anticuerpos específicos contra la baSBP ayudaría a determinar el lugar de su biosíntesis y a comprobar si la hipótesis planteada es correcta.

CONSIDERACIONES FINALES

Se ha demostrado la existencia de proteína transportadora de esteroides sexuales (SBP) en el suero de Bufo arenarum. La proteína se encuentra en altas concentraciones, y por sus características físico-químicas, es muy semejante a la SBP humana. Esto garantiza, en cierto modo, que algunos de los resultados que se obtengan en el Bufo arenarum podrán servir de base para el estudio en humanos.

Por otro lado, se ha desarrollado un método de aplicación general en cromatografía de afinidad, que mediante el reciclaje de la muestra por una columna auxiliar, permite aumentar considerablemente el rendimiento. De esta forma, relativamente simple, se podrá obtener suficiente cantidad de material como para emprender estudios más detallados sobre la naturaleza de la interacción entre el esteroide y la SBP, como así también sobre su biosíntesis, degradación y regulac

Basándose en los resultados de la caracterización físico-química, de los estudios cinéticos y de las simulaciones, se ha postulado un modelo cuyas principales características son las siguientes:

La baSBP está compuesta por 2 subunidades, las que al no estar unidas por puentes disulfuro se encuentran en equilibrio con el dímero.

El esteroide se ubica entre las subunidades, contribuyendo ambas a la unión mediante sitios de anclaje distintos; una subunidad se une al esteroide del mismo lado del plano ecuatorial que los metilos angulares y la otra subunidad del lado opuesto. La interacción entre las subunidades es tanto mayor cuanto más planar es el ligando.

- La proteína se encuentra en el suero en una concentración tal que predomina el dímero y es ésta la única forma fisiológicamente activa.

- El ligando puede asociarse a los monómeros. La constante de velocidad de disociación de éstos es mayor que la del dímero, ya que teniendo menos sitios de anclaje, la probabilidad de disociación es mayor. Las constantes de velocidad de disociación de los monómeros son semejantes

El ligando puede inducir la asociación de los monómeros. Esta asociación tiene un valor máximo cuando la relación ligando/dímero es de 1:1. Un exceso de ligando produce el efecto contrario, dado que el esteroide no puede servir de nexos entre las subunidades, sino que más bien contribuye a disociarlas.

Asimismo se ha observado que la baSBP es la única proteína en el suero de esta especie con capacidad de transportar esteroides sexuales (DHT, T y E2). Esto sin duda simplifica el modelo experimental con relación a otras especies, donde el transporte es compartido con la albúmina y la transcortina.

Por último, esta proteína puede ser regulada por tratamientos endócrinos (ovariectomía, administración de estradiol) y en consecuencia el Bufo arenarum constituye una especie apropiada para realizar estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la SBP.

BIBLIOGRAFIA

- 1- L.I. Gilbert, W.E. Bollenbacher y N.A. Granger (1980). *Ann. Rev. Physiol.*, 42: 493.
- J. Roth, D. LeRoith, J. Shiloach, J.L. Rosenzweig, M.A. Lesniak y J. Havrankova (1982). *New England J. Med.*, 306: 523.
- 3- C. Remy, J. Girardie, M.P. Dubois (1979). *Gen.Comp. Endocrinol.*, 37: 93.
- 4- T. Marvo (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6622.
- 5- A.W. Barksdale (1975). *Science*, 166: 831.
- 6- W.E. Timberlake (1976). *Dev. Biol.*, 51: 202.
- 7- G.P. Arsenault, K.Biemann, A.W. Barksdale y T.C. Mc Morris (1968). *J. Am. Chem. Soc.*, 90: 5635.
- 8- T.C. Mc Morris, R. Seshadri, G.R. Weihe, G. P. Arsenault y A. W. Barksdale (1975). *J. Am. Chem. Soc.*, 97: 2545.
- 9- S.V. Pathre y C.J. Mirocha (1979). En "Strogens in the Environment", ed. J.A. Mc Lachan, Elsevier North-Holland, New York, p. 265.
- 10- B.S. Katzenellenbogen, J.A. Katzenellenbogen y D. Mordecai (1979). *Endocrinology*, 105: 33.
- 11- D. Feldman, L.G. Tokes, P.A. Stathis, S.C. Miller, W. Kurz y D. Harvey (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4722.
- 12- J. Roth, D. LeRoith, J. Shiloach y C. Rubinovitz (1983). *Clin. Res.* 31: 354.
- 13- C.N. Hales (1978). *Febs Letters*, 94: 10.
- 14- Y.A. Fontaine (1984). *Mundo Científico*, 4: 540.
- 15- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, y J.D. Watson (1983). En "Molecular Biology of the Cell". (Garlan Publishing, Inc. N.Y.), Cap. 1 y 13.
- 16- J. Kraicer (1975). En "The anterior Pituitary". A. Tixier-Vidal y M.G. Farquhar eds. Acad. Press, New York, p.21.
- 17- F. Labrie, M. Gauthier, G. Pelletier, P. Borgeat, A. Lemay y J. Gouge (1973). *Endocrinology*, 93: 903.
- 18- P.E. Lacy, S.L. Howell, D.A. Young, and C.J. Fink (1968). *Nature*, 219: 1177.
- 19- P.E. Lacy y W.J. Malaisse (1973). *Recent Progress in Hormone Research*, 29: 199.
- 20- P.E. Lacy, E.H. Fink y R.C. Codilla (1975). *Lab.*

- Invest. 33: 570.
- 21 G.G. Moskalowski, J. Thyberg y U. Friberg (1976). *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 304.
 - 22- J.E. Gerich, M. A. Charles y G. M. Grodsky (1976). *Annu. Rev. Physiol.*, 38: 353.
 - 23- P.P. Foá (1973). *Am. Zool.*, 13: 613.
 - 24- C. Patzelt, D. Brown y B. Jeanrenaud (1977). *J. Cell Biol.*, 73: 578.
 - 25- A.M. Poisner (1975). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 253: 653.
 - 26- J.D. Jamieson y G.E. Palade (1971). *J. Cell Biol.*, 50: 135.
 - 27- A.C. Enders (1973). *Biol. Reprod.*, 8: 158.
 - 28- T.A. Higuchi, A. Kaneko, J.H. Abel y G.D. Niswender (1979). *Endocrinology* 104: 476.
 - 29- M. Corteel (1973). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys (Suppl)*, 13: 249.
 - 30- R.T. Gemmell, B.D. Stacy y G.D. Thorburn (1974). *Biol. Reprod.*, 11: 447.
 - 31- R.T. Gemmell y B.D. Stacy (1977). *J. Reprod. Fertil* 49: 115.
 - 32- H.R. Sawyer, J.H. Abel, M.C. McClellan, M. Schmitz y G.D. Niswender (1979). *Endocrinology*, 104: 476.
 - 33- D.L. Willcox (1983). *Biol. Reprod.* 29: 487.
 - 34- D. Parry, D.L. Willcox y G.D. Thorburn (1980). *J. Reprod. Fertil.*, 60: 349.
 - 35- E.P. Giorgi y N.D. Stein (1981). *Endocrinology* 108: 688.
 - 36- B.C. Bruot y D.C. Collins (1983). *Biol. Reprod.* 29: 286.
 - 37- U. Westphal (1970). *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 10: 15.
 - 38- K.B. Eik-Nes (1975). En "The Handbook of Physiology" Sect 7, Vol. 5 (R.O. Greep y E.B. Astwood, eds.). American Physiol. Society, Washington D.C. p. 95.
 - 39- U. Westphal (1980). En "Pharmacological Modulation of Steroid Action" (E. Genazzani, F. DiCarlo, W. Mainwaring y P. Ian, eds.). Raven Press, N.Y., p. 33
 - 40- L.L. Ewing, C.E. Chubb y B. Robaire (1976). *Nature* 264: 84.
 - 41- T.F. Davies y M. Platzer (1981). *Endocrinology* 108: 1757.
 - 42- W.A. Condon y J.L. Plate (1981). *Biol. Reprod.*, 25: 950.
 - 43- C.M. Szego y R.J. Pietras (1981). En "Biochemical Action of Hormones" (G. Litwack ed.). Acad. Press N.Y. Vol. III, p. 307.

- 44- P.K. Siiteri, J.T. Murai, G.L. Hammond, J.H. Nisker
W.J. Raymoure y R.W. Kuhn (1982). *Recent Prog. Hor
Res.*, 38: 457.
- 45- C.P. Sibley, B.J. Whitehouse, G.P. Vinson y C.
Goddard (1980). *J. Steroid Biochem.*, 13: 1231.
- 46- E. Oppenheimer (1913). *Biochem. Z.* 55: 134.
- 47- U. Wesphal (1983). *J. Steroid Biochem.*, 19: 1.
- 48- W.M. Pardridge (1981). *Endocrine Reviews*, 2: 103.
- 49- T.W. Furlon y N.H. Bass (1976). *Brain Res.* 110:336.
- 50- C.R. Honig, C.L. Odoroff y J.L. Frierson (1980). *Am
J. Physiol.*, 238: H31.
- 51- C.H. Baker, E.T. Sutton y D.L. Davis (1980). *Am. J.
Physiol.*, 238: H745.
- 52- C.A. Goresky y C.P. Rose (1977). *Fed. Proc.* 36:2629
- 53- W.M. Pardridge y L.J. Mietus (1979). *Endocrinology*
106: 1137.
- 54- N. Simionescu (1983). *Physiol. Reviews.*, 63:1536.
- 55- M.E. Fant, R.D. Harbison y R.W. Harrison (1979). *J.
Biol. Chem.*, 254: 6218.
- 56- D. Culos y M. Watanabe (1982). *J. Steroid Biochem.*
17: 67.
- 57- D. Williams y J. Gorski (1973). *Biochemistry* 12:297.
- 58- E. Milgron, M. Atger y E.E. Baulieu (1973). *Biochim
Biophys. Acta*, 320: 267.
- 59- R.W. Harrison, S. Fairfield y D.N. Orth (1975).
Biochemistry, 14: 1304.
- 60- G.S. Rao, K. Schulze-Hagen, M.L. Rao y H. Breuer
(1976). *J. Steroid Biochem.*, 7: 1123.
- 61 P.G.W. Plageman y J. Erbe (1976). *Biochem.Pharmacol*
25: 1489.
- 62- R.E. Muller y H.H. Wotiz (1979). *Endocrinology* 105:
1107.
- 63- P.L. Balard (1979). En " *Glucocorticoid Hormone
Action*". (J.D. Baxter y G.G. Rousseau, eds.) p. 25.
Springer-Verlog, Berlin.
- 64- I. Nenci, G. Fabris, E. Marchetti y A. Marzola
(1980). En " *Perspectives in Steroid Receptor Res.*".
(F. Bresciani, ed.) p. 61. Raven Press, N.Y.
- 65- I. Nenci, E. Marchetti, E. Marzola y G. Fabris.
(1981). *J. Steroid Biochem.*, 14: 1139.
- 66- K.S. Zanker, G.W. Prokscha y G. Blumel (1981), *J.
Cancer Res. Clin. Oncol.*, 100: 135.
- 67- S.E. Sadler y J.L. Maller (1982). *J. Biol. Chem.*,
287: 355.
- 68- I. Nenci, G. Marzola y E. Marchetti (1981). *J.*

- Steroid Biochem., 15: 231.
- 69- G.A. Puca, E. Nola, A.M. Molinari, I. Armetta y V. Sica (1981). J. Steroid Biochem., 15: 307.
 - 70- J.A. Berliner, K. Bennett, L.E. Gerschenson y J. DeVellis (1976). J. Cell. Biol., 70: 116A.
 - 71- T.R. Brown, E.E. Greene, L.P. Bullok y C.W. Bardin (1978). Endocrinology, 103: 1374.
 - 72- B.T. Keller, G.M. Landes y P.A. Kitos (1982). Biochim. Biophys. Acta, 717: 228.
 - 73- R.J. Pietras y C.M. Szego (1979). J. Cell. Physiol. 98: 145.
 - 74- R.J. Pietras y C.M. Szego (1977). Nature, 265: 69.
 - 75- S. Bordin y P.H. Petra (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5678.
 - 76- B.W. O'Malley (1974). Science, 183: 610.
 - 77- B.W. O'Malley, R.J. Schwartz y W.T. Schrader (1976) J. Steroid Biochem., 7: 1151.
 - 78- J. Gorski y J.A. Nicolette (1963). Arch. Biochem. Biphys., 103: 418.
 - 79- G.C. Mueller, A.M. Herranen y K.F. Jervell (1958). Recent Prog. Horm. Res., 14:95.
 - 80- T.H. Hamilton, C.C. Widnell y J.R. Tata (1965). Biochem. Biophys. Acta, 108:168.
 - 81- L. Chan, A.R. Means y B.W. O'Malley (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 1870.
 - 82- B.W. O'Malley y W.L. McGuire (1968). J. Clin. Inves 47: 654.
 - 83- F.T. Kenney y F.J. Kull (1963). Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 50: 493.
 - 84- I.S. Edelman y G.D. Fimognari (1968). Recent. Prog. Horm. Res., 24: 1.
 - 85- M. Buresova y E. Gutman (1971). J. Endocrinol., 50: 643.
 - 86- C.D. Kochakian (1969). Gen. Comp. Endocrinol,13:146
 - 87- J.E. Zerwekh, T.J. Lindell y M.R. Haussler (1976). J. Biol. Chem., 251: 2388.
 - 88- T. Oka y R.T. Schimke (1969). J. Cell Biol., 43:123
 - 89- G.S. McKnight (1978). Cell 14: 403.
 - 90- B. Peterkofsky y G.M. Tomkins (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 222.
 - 91- E.V. Jensen (1965). Proc. Can. Cancer Res. Conf.,6: 143.
 - 92- W.D. Noteboom y J. Gorski (1965). Arch. Biochem. Biophys., 111: 559.
 - 93- M.R. Sherman, P.L. Corvol y B.W. O'Malley (1970).

- J. Biol. Chem., 245: 6085.
- 94- J.D. Baxter, G.G. Rousseau, M.C. Benson, R.L. Gareu, J. Ito y G.M. Tomkins (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 1892.
- 95- S. Tang y S. Liao (1971). J. Biol. Chem., 246: 16.
- 96- P.F. Brumbaugh, M.R. Hughes y M.R. Haussler (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:4871.
- 97- M.A. Yund, D.A. King y J.W. Fristom (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 6039.
- 98- W.W. Grody, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1982). Endocrine Reviews, 3: 141.
- 99- I. Nenci, G. Fabris, E. Marchetti y A. Marzola. (1980). Virchows Arch (Cell Pathol), 32: 139.
- 100- G.T. Talwar, S.J. Segal, A. Evans y O.W. Davidson. (1964). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52: 1059.
- 101- B.W. O'Malley, M.R. Sherman y D.O. Toft (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67: 501.
- 102- J. Gorski, W. Welshons y D. Sakai (1984). Mol. Cell Endocrinol., 36: 11.
- 103- R.C.M. Simmen, B.S. Dumber, V. Guerreiro, J.G. Chafouleas, J.H. Clark y A.R. Means (1984). J. Cell Biol., 99: 588.
- 104- F. Auricchio, A. Migliaccio, G. Castoria, A. Rotondi y S. Lastoria (1984). J. Steroid Biochem., 20: 31.
- 105- R.J. Pietras y C.M. Szego (1975). Nature, 253: 357.
- 106- R.D. Palmiter, E.R. Mulvihill, J.H. Shepherd y E.S. McKnight (1981). J. Biol. Chem., 256: 7910.
- 107- B.W. O'Malley, T.C. Spelsberg, W.T. Schrader, F. Chytil y A.W. Steggles (1972). Nature, 235: 141.
- 108- T.C. Spelsberg, A.W. Steggles, F. Chytil y B.W. O'Malley (1972). J. Biol. Chem., 247: 1368.
- 109- R.W. Scott y F.R. Frankel (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1291.
- 110- S.H. Socher, J.F. Krall y B.W. O'Malley (1976). Endocrinology, 99: 891.
- 111- M. Kalimi, S.Y. Tsai, M-J. Tsai, J.H. Clark y B.W. O'Malley (1976). J. Biol. Chem., 251: 516.
- 112- R.C. Jaffe, S.H. Socher y B.W. O'Malley (1975). Biochim. Biophys. Acta, 399:403.
- 113- S.J. Higgins, G.G. Rousseau, J.D. Baxter y G.M. Tomkins (1973). J. Biol. Chem., 248: 5866.
- 114- R.E. Buller, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1975). J. Biol. Chem., 250: 809.
- 115- T.C. Spelsberg, A.W. Steggles y B.W. O'Malley. (1971). J. Biol. Chem., 246: 4188.

- 116- E.R. Barrack y D.S. Coffey (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 7265.
- 117- L.D. Snow, H. Erikson, J.W. Hardin, L. Chan, R.L. Jackson, J.H. Clark y A.R. Means (1978). *J. Steroid Biochem.*, 9: 1017.
- 118- L. Chan, W.A. Bradley, R.L. Jackson y A.R. Means. (1980). *Endocrinology*, 106: 275.
- 119- W.A. Coty, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1979). *J. Steroid Biochem.*, 10: 1.
- 120- M.R. Hughes, J.G. Compton, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1981). *Biochemistry*, 20: 2481.
- 121- J.C. Compton, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105: 96.
- 122- E.R. Mulvihill, J.P. LePenec y F. Chambon (1982). *Cell*, 24: 621.
- 123- a: V.L. Chandler, B.A. Maler y K.R. Yamamoto. (1983). *Cell*, 27: 257.
- 123- b: N.C. Lan, M. Karin, T.N. Guyen, A. Wiesz, M.J. Birnbaum, N.L. Eberhardt y J.D. Baxter (1984). *J. Steroid Biochem.*, 20: 77.
- 124- M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve, R.I. Richards P. Krauter, H.M. Westphal y M. Beato (1984). *Nature* 308: 513.
- 125- R. Renkawitz, G. Schutz, D. van der Ahe y M. Beato (1984). *Cell* 37: 503.
- 126- N. Hynes, A.J.J. Van Ooyen, N. Kennedy, P. Herrlich H. Ponta y B. Groner (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 80: 3637.
- 127- E. Buetti y H. Diggelman (1983). *Embo. J.*, 2: 1423
- 128- J. majors y H. Varmus (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5866.
- 129- V.L. Chandler, B.A. Maler y K.R. Yamamoto (1983). *Cell*, 33: 489.
- 130- D.C. Dean, B.J. Knoll, M.E. Riser y B.W. O'Malley. (1983). *Nature*, 305: 551.
- 131- R.E. Buller, D.O. Toft, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1975). *J. Biol. Chem.*, 250: 801.
- 132- E. Milgron, M. Atger, E-E Baulieu (1973). *Biochem.* 12: 5198.
- 133- J.H. Clark, J.N. Anderson y E.J. Peck (1973). *Steroid*, 22: 707.
- 134- J.H. Clark, E.J. Peck y J.N. Anderson (1974). *Nature*, 251: 446.
- 135- W.V. Vedeckis, M.R. Freeman, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1980). *Biochemistry*, 19: 335.

- 136- W.V. Vedeckis, W.T. Schrader y B.W. O'Malley (1980). *Biochemistry*, 19: 343.
- 137- S. Liao, S. Smythe, J.L. Tymoczko, G.P. Rossini, C. Chen y R.A. Hiipakka (1980). *J. Biol. Chem.*, 255: 5545.
- 138- E.B. Thompson y M.E. Lippman (1974). *Metabolism*. 23: 159.
- 139- E.E. Baulieu, F. Godeau, M. Schorderet y S. Schorderet-Slatkine (1978). *Nature*, 275: 593.
- 140- A. Munck, C. Wira, D.A. Young, K.M. Mosher, C. Hallahan y P.A. Bell (1972). *J. Steroid Biochem.* 3: 567.
- 142- D. Duval, S. Durant y F. Homo-Delarche (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, 737: 409.
- 143- R.I. Henkin, A.G.T. Casper, R. Brown, A.B. Harlan y F.C. Bartter (1968). *Endocrinology*, 82: 1058.
- 144- D.M. Spain (1975). En "Handbook of Physiology: Sec 7: Endocrinology, Vol. VI, Adrenal Gland, Cap 18, p. 263, (Williams y Wilkins Co., Baltimore.
- 145- L. Amaral y S. Werthamer (1981). *Experientia*, 37: 903.
- 146- F.H. De Jong, A.H. Hey y H.J. Van Der Molen (1973) *J. Endocrinol.*, 57: 277.
- 147- J.W. Funder (1979). *J. Steroid Biochem.*, 11: 87.
- 148- G.P. Talwar (1979). *J. Steroid Biochem.*, 11: 27.
- 149- C.W. Bardin, N. Musto, G. Gunsalus, N. Kotite, S-L. Cheng, F. Larrea y R. Becker (1981). *Ann. Rev. Physiol*, 43: 189.
- 150- W. Rosner y R.A. Darmstadt (1973). *Endocrinology*. 92: 1700.
- 151- R.A. Vigersky, S. Kono, M. Sauer, M.B. Lipsett y D.L. Loriaux (1979). *J. Clin. Endocrinol. Met.* 49: 899.
- 152- T. Kato y R. Horton (1968). *J. Clin. Endocr.*, 28: 1160.
- 153- R.S. Mathur, L.O. Moody, S.C. Landgrebe, M.R. Peress, P.F. Rust y H.O. Williamson (1982). *Fertil. Steril.*, 38: 207.
- 154- P. Biffignandi, C. Massucchetti y G.M. Molinatti. (1983). *Fertil. Steril.*, 39:385.
- 155- A.F. Clark, S. Marcelus, B. Delory y C.E. Bird. (1975). *Fert. Esteril.*, 26: 1001.
- 156- P. Biffignandi, C. Massucchetti y G.M. Molinatti (1984). *Endocrine Reviews*, 5: 498.
- 157- R. Tavernetti, W. Rosenbaum, W.G. Kelly, N.F.

- Christy y M.S. Roginski (1967). *J. Clin Endocrinol Metab.*, 27: 920.
- 158- M.S. Khan, B.B. Knowles, D.P. Aden y W. Rosner. (1981). *J. Clin. Endocrinol. Met.*, 53: 448.
- 159- P.H. Petra, F.Z. Stanczyk, D.F. Seneary, P.C. Namkung, M.J. Novy, J.B.A. Ross, E. Turner y J.A. Brown (1983). *J. Steroid Biochem.*, 19: 699.
- 160- Y. Suzuki y H. Sinohara (1979). *Acta Endocrinol.* 90: 669.
- 161- S.H. Burstein (1969). *Steroids*, 14: 263.
- 162- P. Cuatrecasas (1970). *J. Biol. Chem.*, 245: 3059.
- 163- V. Sica, I. Parikh, E. Nola, G.A. Fuca y P. Cuatrecasas (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 6543.
- 164- K.E. Mickelson y P.H. Petra (1975). *Biochemistry*, 14: 957.
- 165- W. Rosner y R.N. Smith (1975). *Biochemistry*, 14: 4813.
- 166- E.E. Turner, J.B. Alexander Ross, P.C. Namkung y P.H. Petra (1984). *Biochemistry*, 23: 492.
- 167- Y. Suzuki, E. Itagaki, H. Mori y T. Hosoya (1977). *J. Biochem.*, 81:1721.
- 168- K.E. Mickelson y P.H. Petra (1978). *J. Biol. Chem.* 253: 5293.
- 169- P.H. Petra y J. Lewis (1980). *Anal. Biochem.*, 105: 165.
- 170- W.H. Pearlman, I.F.F. Fong y J-S H. Tou (1969). *J. Biol. Chem.*, 244: 1373.
- 171- C.B. Anfisen (1973). *Science*, 181:223.
- 172- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951). *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- 173- R.K. Scopes (1974). *Anal. Biochem.*, 59: 277.-
- 174- A. Belgorosky y M.A. Rivarola (1982). *Medicina (Buenos Aires)*, 42: 39.
- 175- J. C. Calvo (1985). Programa escrito en BASIC para una computadora HP-86 (no publicado).
- 176- D. Rodbard, M.D. Peter, J. Munson y A.K. Thakur (1980). *Cancer*, 46: 2907.
- 177- Biodata handling with microcomputers. Elsevier Biosoft, 68 Hills Road, Cambridge CB2 1LA, England
- 178- E.M. Ritzen, F.S. French, C. Weddington, S.N. Nayfeh y V. Hanson (1974). *J. Biol. Chem.*, 249: 6597
- 179- G.K. Ackers (1970). *Adv. Prot. Chem.*, 24: 243.
- 180- R.G. Martin y B.N. Ames (1961). *J. Biol. Chem.* 236: 1372.
- 181- H.K. Schachman (1959). " Ultracentrifugation

- Biochemistry". p. 239. Academic Press. New York.
- 182- L.M. Siegel y K.J. Monty (1966). *Biochim. Biophys. Acta*, 112: 346.
- 183- F. Perrin (1936). *J. Phys. Radium*, 7:1.
- 184- G. Cahiez, A. Alexakis y J. F. Normant. *Tetrahedron Letters*, N° 33, p. 3013.
- 185- M.M. Constantin Georgoulis, B. Gross y J.C. Ziegler (1971). *C.R. Acad. Sc. Paris*. 273: 378.
- 186- N.A. Musto, G.L. Gunsalus, M. Miljkovic y C.W. Bardin (1977). *Endocrine Res. Commun.*, 4: 147.
- 187- C.W. Greenhalgh, H.B. Henbest y E.H.R. Jones (1952) *J. Chem. Soc.* p. 2375.
- 188- K.E. Mickelson y P. Petra (1975). *Biochemistry*, 14: 957.
- 189- S.C. March, I Parikh y P. Cuatrecasas (1974). *Anal Biochem.*, 60: 149.
- 190- I. Parikh, S.C. Marchs y P. Cuatrecasas (1974). *Methods in Enzimology*, 34: 77.
- 191- a: L. Ornstein (1964). *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 121:321
b: B.J. Davis (1964). *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 121:404
- 192- U.K. Laemmli y M. Favre (1973). *J. Mol. Biol.*, 80: 575.
- 193- K. Weber y M. Osborn (1969). *J. Biol. Chem.*, 244: 4406.
- 194- Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Laboratory Techniques (1982). Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Suecia.
- 195- M.M. Bradford (1976). *Analyt. Biochem.* 72: 248.
- 196- D.W. Sammons, L.D. Adams y E.E. Nishizawa (1981). *Electrophoresis*, 2: 135.
- 197- C.E.M. Wolfenstein, J.A. Santomé y A. C. Paladini (1966). *Acta Physiol. Lat. Amer.* 16: 194.
- 198- J.W. Eveleigh y G.D. Winter (1970). "Protein sequence determination". (S.B. Needleman ed.) Chapman & Hill Ltd. Londres. p. 94.
- 199- HP-86 Statistical Analysis Pac. 82837A. (1985).
- 200- N. J. Kotite y N. A. Musto (1982). *J. Biol. Chem.* 257:5118.
- 201- D. Rodbard (1979). *Amercan J. Phys.*, 6: E 203.
- 202a D. Rodbard y K.J. Catt (1972). *J. Steroid Biochem.* 3: 255.
- 202b *Mathematical Methods for Digital Computers* (1960). (A. Ralston y H.S. Wilf, eds.) Vol I, J. Wiley & Sons, Inc., New York.
- 203- S.L. Ross (1979). "Ecuaciones Diferenciales", (ed.

- Reverté).
- 204- M. Otto y M. Snejdarkova (1981). *Anal. Biochem.* 111:111.
- 205- E.E. Turner, J.B. Alexander Ross, P.C. Namkung y P. H. Petra. (1984). *Biochemistry*, 23: 492.
- 206- W. Rosner, D. P. Aden y M. Saeed Khan (1984). *J. Clin. Endoc. Met.*, 59: 806.
- 207- P .O. Seglen (1976). *Methods Cell Biol.*, 13: 29.
- 208- K. Wolf y M. C. Quimby (1964). *Science*, 144: 1578.
- 209- J. C. Cresto, D. P. Udrisar, R. Ibarra, M. C. Camberos, J. C. Basade y S.F. de Majo (1981). *Acta Phys. Lat. Amer.*, 31: 3.
- 210- G.F. Lata. H-K Hu, G. Bagshaw y R.F. Tucker (1980) *Archs. Biochem. Biophys.*, 199: 220.
- 211- M. Pugeat, B. Rocle, G. P. Chrousos, J. F. Dunn, M. P. Lipsett y B. C. Nisula (1984). *J. Steroid Biochem*, 20: 473.
- 212- A. Vermeulen y L. Verdonck (1968). *Steroids* 11: 609.
- 213- C. Bonne y J.P. Raynaud (1975). *Steroids*, 26: 227.
- 214- L.B. Gorbacheva (1975). *Biokhimiya*, 22: 70.
- 215- G. Defaye, M. Basset, N. Monnier y E. M. Chambaz *Biochim. Biophys. Acta*, 623: 280.
- 216- T. G. Muldon y U. Westphal (1967). *J. Steroid Biochem.*, 242: 5636.
- 217- T. Kato y R. Horton (1968). *J.Clin.Endoc.* 28: 1160
- 218- W. Rosner, S. Toppel y R.N. Smith (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, 351: 92.
- 219- An-Fei Hsu y P. Troen (1978). *J. Clin. Invest.* 61: 1611.
- 220- N. A. Musto, B. L. Gunsalus, M. Miljkovic y C. W. Bardin (1977). *Endocrine Res. Comm.*, 4: 147.
- 221- A. Butenandt, H. Cobler y J. Schmidt (1936). *Chem. Berichte*, 69: 448.
- 222- L. Ruzicka y H. R. Rosenberg (1936). *Helv. Chim. Acta*, 19: 357.
- 223- L. F. Fieser y M. Fieser (1966). "Steroids". Reinhold Publishing Corp., New York.
- 224- E. Gianazza y P. G. Righetti (1979). "Electrophoresis '79". (B. J. Radola ed.). W. de Gruyter , Berlin.
- 225- J.B. Swaney (1974). *Anal. Biochem.*, 58: 337.
- 226- J.S. Tung y C.A. Knight (1972). *Anal. Biochem.*, 48: 153.
- 227- J.T. Stoklosa y H.W. Latz (1975). *Anal. Biochem.*,

- 68: 358.
- 228- H. Furthmayer y R. Timpl (1971). *Anal. Biochem.*,
41: 510.
- 229- M.S. Bretscher (1971). *Nature New Biol.*, 231: 229.
- 230- P. Petra (1979). *J. Steroid Biochem.*, 11: 245.
- 231- G. Weber (1975). *Advances in Protein Chemistry*,
29: 1.
- 232- O.A. Strel'chyonok, G.V. Avvakumov y L.I. Survilo.
(1984). *Biochim. Biophys. Acta*, 802: 459.
- 233- C. Mercier-Bodard, A. Alfsen y E.E. Baulieu (1970)
Acta Endoc. Suppl. 64: 204.

APENDICES

APENDICE A:

```
10 CLEAR
20 DISP "Cinetica bimolecular reversible : calculo del tiempo requerido"
30 DISP "para alcanzar un x % del valor de union al equilibrio con una"
40 DISP "concentracion dada de receptor." @ WAIT 7000
50 CLEAR
60 DISP "1-Indique si desea imprimir"
70 DISP "2-Entre los valores de H,Q,Kd,kl,dt,e,x%"
80 ON KEY# 1,"H(nM)" GOSUB H
90 ON KEY# 2,"Q(nM)" GOSUB Q
100 ON KEY# 3,"Kd(nM)" GOSUB Kd
110 ON KEY# 4,"kl(1/nM.m)" GOSUB kl
120 ON KEY# 5,"dt(min)" GOSUB dt
130 ON KEY# 6,"e(%)" GOSUB e
140 ON KEY# 7,"x%((1))" GOSUB x
150 ON KEY# 8,"PRINT(S/N)" GOSUB PR
160 ON KEY# 14,"CONTINUAR" GOTO 190
170 KEY LABEL
180 GOTO 180
190 IF A$="S" OR A$="s" THEN PRINT "H(nM),Q(nM),Kd(nM),kl(1/nM.min),dt(min),e,x%
=";H;Q;Kd;kl;dt;e;x
200 DISP "H,Q,Kd,kl,dt,e,x%=";H;Q;Kd;kl;dt;e;x
210 DT=dt
220 a=.5*(H+Q+Kd+((H+Q+Kd)^2-4*H*Q)^.5)
230 b=.5*(H+Q+Kd-((H+Q+Kd)^2-4*H*Q)^.5)
240 t=0 @ dt=DT
250 FOR J=1 TO 1000
260 t=t+dt
270 A=1-x*b/a-(1-x)*EXP (t*kl*(a-b))
280 ! DISP "A=";A
290 IF A<0 THEN 300 ELSE 330
300 t=t-dt
310 dt=dt/10
320 GOTO 260
330 IF A<e THEN 350
340 NEXT J
350 DISP "El tiempo requerido para B= ";x*100;"% de Be es";t;" minutos"
360 IF A$="S" OR A$="s" THEN PRINT "t(;"x*100;")=";t
370 GOTO 80
380 H:
390 DISP "H(nM)" @ INPUT H@ ON KEY# 1," " GOTO 80
400 CLEAR @ KEY LABEL
410 RETURN
420 Q:
430 DISP "Q(nM)" @ INPUT Q@ ON KEY# 2," " GOTO 80
```

```
440 CLEAR @ KEY LABEL
450 RETURN
460 Kd:
470 DISP "Kd(nM)" @ INPUT Kd@ ON KEY# 3," " GOTO 80
480 CLEAR @ KEY LABEL
490 RETURN
500 k1:
510 DISP "k1(1/nM.min)" @ INPUT k1@ ON KEY# 4," " GOTO 80
520 CLEAR @ KEY LABEL
530 RETURN
540 dt:
550 DISP "dt(min.)" @ INPUT dt@ ON KEY# 5," " GOTO 80
560 CLEAR @ KEY LABEL
570 RETURN
580 e:
590 DISP "e=f(t=0)-f(0)" @ INPUT e@ ON KEY# 6," " GOTO 80
600 CLEAR @ KEY LABEL
610 RETURN
620 x:
630 DISP "x% (<1)" @ INPUT x@ ON KEY# 7," " GOTO 80
640 CLEAR @ KEY LABEL
650 RETURN
660 PR:
670 CLEAR
680 DISP "PRINT(S/N)" @ INPUT A$
690 IF A$="S" EXOR A$="s" EXOR A$="N" EXOR A$="n" THEN 680
700 IF A$="S" OR A$="s" THEN 710 ELSE 720
710 PRINTER IS 701,80 @ PRINT CHR# (27)"&"&k2S" @ GOTO 730
720 PRINTER IS 1
730 C$="PRINT="&A$
740 ON KEY# 8,C$ GOTO 80 @ CLEAR @ KEY LABEL
750 RETURN
760 END
```

APENDICE B: Programa de simulacion

```
10 ! Simulacion correspondiente a 1 sitio de union
20 ! NOTACION : B=U v F=L
30 CRT IS 1 @ ALPHA @ CLEAR
40 ON ERROR GOTO 50 @ GOTO 70
50 IF ERRN =25 THEN 90
60 DISP "Coloque el UTIL/1 y el GDUMP, luego CONT" @ PAUSE
70 LOADBIN "GDUMP"
80 ! LOADBIN "UTIL/1"
90 OFF ERROR
100 SETTIME 0,0
110 DIM BOUND(1500),FREE(1500),BF(1500),HBF(1500),UT(1500),BB(30),FF(30),BBc(30)
,FFc(30),HT(20)
120 PRINTER IS 701 @ DISP "Encendio la impresora?" @ PRINT
130 PRINT CHR$(27)&"%k25" @ CLEAR
140 DISP "Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Archiv"
150 INPUT Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Z$
160 ! TAKE KEYBOARD
170 PRINT "Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Archv"
180 PRINT Bo;Fo;Q;C;k1;k2;k3;Tc;Ce;IcM;Z$
190 Ho=Bo+Fo @ B=Bo @ F=Fo @ H=0
200 FOR U=1 TO 100
210 K=k3 @ k3=0 @ dt=.01
220 ALPHA @ CRT IS 1
230 H=Ho+H*.5 @ F=H @ B=Bo @ PRINT "H=";H @ HT(U)=H
240 IF U>2 THEN 250 ELSE 260
250 IF BB(U-1)/FF(U-1)/(BB(1)/FF(1))<.02 THEN STOPPED
260 IT,T,Te,R,X=0 @ YP=.1
270 KJ=dt
280 FOR IT=1 TO 1000
290 IF IT>1499 THEN 300 ELSE 320
300 PRINT "IT>1500 ,STOP" @ STOP
310 ! ***** INTEGRACION *****
320 dt=KJ
330 T=T+dt
340 Ft=F @ Bt=B
350 F=(B*k2-F*(Q-B)*k1-F*C*k3)*dt+F
360 B=(Ft*(Q-B)*k1-B*k2)*dt+B
370 IF IT=1 THEN 380 ELSE 390
380 IF ABS (B-Bt)/Q>IcM OR ABS (F-Ft)/H>IcM THEN 400 ELSE 450
390 IF ABS (B-Bt)/Bt>IcM OR ABS (F-Ft)/Ft>IcM THEN 400 ELSE 450
400 T=T-dt
410 dt=dt*YP
420 B=Bt @ F=Ft
430 GOTO 330
```

```
440 ' ##### Condicion de equilibrio / salida de resultados #####
450 b=k2/k1+H+Q @ be=(b-SQR (b*b-4*Q*H))/2
460 BOUND(IT)=B @ FREE(IT)=F @ UT(IT)=T
470 IF ABS (B-be)/be<Ce AND R=0 THEN 480 ELSE 510
480 PRINT "eZ=";ABS ((H-B-F)/H*100)
490 k3=K @ Te=T @ PRINT "Be";B;"Fe=";F;"Te=";T
500 R=1 @ ITe=IT @ F=F*2/3 @ B=B*2/3 @ Q=Q*2/3 @ H=H*2/3 ! Vol de inc=0,5ml y Vo
l de sc de carbon 0,25 ml.
510 KJ=dt+dt*.01
520 IF T-Te>Tc AND X=0 AND R=1 THEN 530 ELSE 560
530 X=1 @ ITc=IT
540 PRINT "Bc=";B;"Fc=";F;"Ba=";(B+F)*3/2;"Fa=";(H-(B+F))*3/2;"t=";T
550 GOTO 590
560 IF B+F<H*.05 THEN 580
570 NEXT IT
580 PRINT "Bf=";B;"Ff=";F;"Tf=";T
590 GOSUB GRAF1
600 BB(U)=BOUND(ITe) @ FF(U)=FREE(ITe)
610 BBc(U)=BOUND(ITc) @ FFc(U)=FREE(ITc)
620 H=H*3/2 @ Q=Q*3/2
630 NEXT U
640 STOP
650 ' ##### Subrutinas para graficos #####
660 GRAF1:
670 GCLEAR @ GRAPHALL @ CRT IS 701 @ RETURN
680 LOCATE 15,115,35,90
690 SCALE 0,T,0,(H+H*.1)*3/2
700 X=T @ Y=H+H*.1
710 GOSUB DEC
720 FXD LX,LY @ LAXES
730 MOVE 0,(H+H*.2)*3/2 @ LABEL "U vs t(min.)"
740 FOR J=1 TO IT-1
750 MOVE UT(J),BOUND(J) @ PLOT UT(J),BOUND(J)
760 MOVE UT(J),BOUND(J)+FREE(J) @ PLOT UT(J),BOUND(J)+FREE(J)
770 NEXT J
780 LOCATE 130,230,35,90
790 X=FREE(ITe) @ Y=BOUND(ITe)
800 SCALE 0,X,0,Y
810 GOSUB DEC
820 FXD LX+1,LY @ LAXES
830 MOVE 0,BOUND(ITe)+BOUND(ITe)*.1 @ LABEL "U vs L"
840 FOR I=ITe TO IT-1
850 FI=FREE(I) @ BI=BOUND(I)
860 MOVE FI,BI @ PLOT FI,BI
870 NEXT I
880 G$="U="&VAL$ (U)&":D700"
890 ON ERROR GOTO 910
900 GOTO 920
```

```
900 GOTO 920
910 G%=Z%&"U="&VAL% (U)&":D701"
920 GSTORE G%
930 OFF ERROR
940 J,I=0
950 RETURN
960 GRAF2:
970 GRAPH
980 LOCATE 0,250,10,200 @ FRAME @ LOCATE 30,150,35,90
990 X=BB(U-1)*2
1000 Y=BB(1)/FF(1)+BB(1)/FF(1)*.1
1010 SCALE 0,X,0,Y
1020 GOSUB DEC
1030 FXD LX,LY
1040 LAXES
1050 MOVE 0,Y+Y*.1 @ LABEL "U/L" @ MOVE X*3/4,0-Y*.3 @ LABEL "U (nM)"
1060 MOVE BB(1),BB(1)/FF(1)
1070 FOR J=1 TO U-1
1080 X=BB(J) @ Y=BB(J)/FF(J)
1090 DRAW X,Y
1100 NEXT J
1110 MOVE (BBc(1)+FFc(1))*3/2,(BBc(1)+FFc(1))*3/2/(HT(1)-3/2*(BBc(1)+FFc(1)))
1120 FOR I=1 TO U-1
1130 X=(BBc(I)+FFc(I))*3/2 @ Y=X/(HT(I)-X)
1140 DRAW X,Y
1150 NEXT I
1160 I,J=0
1170 GSTORE Z%
1180 RETURN
1190 DEC:
1200 IF X>10 THEN LX=0
1210 IF X>1 AND IP (X)<= 10 THEN LX=1
1220 IF X>.1 AND IP (X)<= 1 THEN LX=2
1230 IF Y>10 THEN LY=0
1240 IF Y>1 AND IP (Y)<= 10 THEN LY=1
1250 IF Y>.1 AND IP (Y)<= 1 THEN LY=2
1260 RETURN
1270 STOPPED:
1280 GOSUB GRAF2
1290 ON ERROR GOTO 1300 @ LOADBIN "GDUMP"
1300 OFF ERROR @ DUMP GRAPHICS
1310 DISP "Termino la ejecucion en ";TIME /60;" minutos"

1320 STOP
1330 END
```

APENDICE B: resultados de la simulacion correspondiente a la figura 6

Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Archv
0 5 139 100 .04788 1.14 .05 1 .001 1 1
H= 5
eλ= .0000000004
Be 4.24499046038 Fe= .75500953964 Te= .853212302203
Bc= 1.60308266797 Fc= .208131773676 Ba= 2.71682166248 Fa= 2.28317833752 t=
1.8712143835
H= 12.5
eλ= .00000000056
Be 10.5359903752 Fe= 1.96400962487 Te= .890461869477
Bc= 3.96832465024 Fc= .522865917093 Ba= 6.736785851 Fa= 5.763214149 t=
1.89992652734
H= 23.75
eλ= 5.05263157895E-10
Be 19.778498571 Fe= 3.97150142888 Te= .928460153054
Bc= 7.40587719076 Fc= .997469624996 Ba= 12.6050202237 Fa= 11.1449797763 t=
1.92892579261
H= 40.625
eλ= 4.67692307692E-10
Be 33.1311895675 Fe= 7.49381043231 Te= .967222202131
Bc= 12.0557128583 Fc= 1.67457398304 Ba= 20.595430262 Fa= 20.029569738 t=
1.98779720105
H= 65.9375
eλ= 0
Be 51.7460319243 Fe= 14.1914680757 Te= 1.04709931209
Bc= 18.6170669072 Fc= 2.70772945743 Ba= 31.9871945469 Fa= 33.9503054531 t=
2.04785192479
H= 103.90625
eλ= 9.62406015038E-11
Be 75.4813951911 Fe= 28.424854809 Te= 1.10912846834
Bc= 25.8486680778 Fc= 3.97124157686 Ba= 44.7298644821 Fa= 59.176385518 t=
2.14020488596
H= 160.859375
eλ= 8.08159300631E-10
Be 99.849658243 Fe= 61.0097167583 Te= 1.02683100207
Bc= 33.565576778 Fc= 5.50352855645 Ba= 58.603658002 Fa= 102.255716998 t=
2.04785192479
H= 246.2890625
eλ= 8.12053925456E-10
Be 117.231188258 Fe= 129.05787424 Te= .728524573469
Bc= 39.8790776674 Fc= 6.95835719437 Ba= 70.2561522925 Fa= 176.032910207 t=
1.73186196767
H= 374.43359375
eλ= 2.67070053727E-10
Be 126.696158304 Fe= 247.737435447 Te= .445076471424

APENDICE B

Simulacion para obtener la concentracion de
carbon (C) que proporcione un valor de 'blanco'
igual al obtenido experimentalmente

Blanco exp. = 1%

0

Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Archv

0 20000 .001 20 .04788 1.14 .05 1 .001 1 1

H= 20000

eλ= 0

Be 9.98782237458E-4 Fe= 19999.9990012 Te= .0030301

Bc= 6.6344752164E-4 Fc= 4886.26822335 Ba= 7329.4033302 Fa= 12670.5966698 t=
1.00433337255

El valor de 'blanco' con C= 20 nM es del 37%

Bo,Fo,Q,C,k1,k2,k3,Tc,Ce,IcM,Archv

0 20000 .001 100 .04788 1.14 .05 1 .001 1 1

H= 20000

eλ= 0

Be 9.98782237458E-4 Fe= 19999.9990012 Te= .0030301

Bf= 8.9394689109E-4 Ff= 195.15298151 Tf= .915968145463

El valor del 'blanco' con C= 100 es del 1%
y coincide con el valor experimental

APENDICE C:

```
10 ' SIMULACION- 2 SITIOS DE UNION (SIN INTERACCIONES)
20 ' SE INDICA UNICAMENTE EL SECTOR DE INTEGRACION
300 dt=KJ
310 T=T+dt
320 Ft=F @ Bt1=B1 @ Bt2=B2
330 F=(B1*k2+B2*k4-F*(Q1-B1)*k1-F*(Q2-B2)*k3-F*C*k5)*dt+F
340 B1=(Ft*(Q1-B1)*k1-B1*k2)*dt+B1
350 B2=(Ft*(Q2-B2)*k3-B2*k4)*dt+B2
360 B=B1+B2
370 IF IT=1 THEN 380 ELSE 390
380 IF ABS ((B-Bt1-Bt2)/(Q1+Q2))>IcM OR ABS (F-Ft)/H>IcM THEN 400 ELSE 440
390 IF ABS ((B-Bt1-Bt2)/(Bt1+Bt2))>IcM OR ABS (F-Ft)/Ft>IcM THEN 400 ELSE 440
400 T=T-dt
410 dt=dt*YP
420 B1=Bt1 @ B2=Bt2 @ F=Ft
430 GOTO 310
440 A=Q1*k1*(H-B)/(k2+k1*(H-B))+Q2*k3*(H-B)/(k4+k3*(H-B))
450 BOUND(IT)=B @ FREE(IT)=F @ UT(IT)=T
460 IF ABS ((B-A)/A)<Ce AND R=0 THEN 470 ELSE 500
470 PRINT "eZ=";ABS ((H-B-F)/H*100)
480 k5=k @ Te=T @ PRINT "Be";B;"Fe=";F;"Te=";T
490 R=1 @ ITe=IT @ F=F*2/3 @ H=H*2/3 @ Q1=Q1*2/3 @ Q2=Q2*2/3 @ B1=B1*2/3 @ B2=B2
*2/3 ! Vol de inc=.5ml y Vol de sc de carbon .25 ml.
500 KJ=dt*dt*.01
510 IF T-Te>Tc AND X=0 AND R=1 THEN 520 ELSE 550
520 X=1 @ ITc=IT
530 PRINT "Bc=";B;"Fc=";F;"Ba=";(B+F)*3/2;"Fa=";(H-B-F)*3/2;"t=";T
540 GOTO 580
550 IF B+F<H*.05 THEN 570
560 NEXT IT
570 PRINT "Bf=";B;"Ff=";F;"Tf=";T
580 GOSUB 6RAF1
590 BB(U)=BOUND(ITe) @ FF(U)=FREE(ITe)
600 BBc(U)=BOUND(ITc) @ FFc(U)=FREE(ITc)
605 H=H*3/2 @ Q1=Q1*3/2 @ Q2=Q2*3/2
610 NEXT U
620 STOP
```

