

Tesis de Posgrado

Metabolismo y transformaciones espontáneas de la 18-hidroxicorticosterona con énfasis en sus condiciones precursoras para la aldosterona

Cozza, Eduardo Néstor

1986

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:

Cozza, Eduardo Néstor. (1986). Metabolismo y transformaciones espontáneas de la 18-hidroxicorticosterona con énfasis en sus condiciones precursoras para la aldosterona. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1952_Cozza.pdf

Cita tipo Chicago:

Cozza, Eduardo Néstor. "Metabolismo y transformaciones espontáneas de la 18-hidroxicorticosterona con énfasis en sus condiciones precursoras para la aldosterona". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1952_Cozza.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

METABOLISMO Y TRANSFORMACIONES ESPONTANEAS DE LA
18-HIDROXICORTICOSTERONA CON ENFASIS EN SUS CONDICIONES
PRECURSORAS PARA LA ALDOSTERONA.

Eduardo Néstor Cozza

Director de Tesis: Dr. Carlos P. Lantos.

1952

Tesis Presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 8 6

Tesis 1952
ej. 2

DEDICATORIAS

A MIS PADRES.

Porque sólo ellos saben lo que significó que yo pudiese estudiar.

Porque siempre me estimularon para seguir adelante.

A MI HERMANO.

Porque de chico lo admiré, luego lo seguí y ahora lo comprendo.

A TODOS ELLOS...

por ser como son.

A MARIA DEL CARMEN

Simultáneamente...

en ella
con ella
por ella
y para ella.

Porque....

"...Todo lo ocupas tú, todo lo ocupas..."

P.N.

A G R A D E C I M I E N T O S

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Carlos P. Lantos por dirigir el presente trabajo de tesis con rigurosidad e interés, permitiendo la creación, inculcando el saber escuchar, esperar y analizar, e introduciéndome al trabajo científico en un campo interdisciplinario.

A todos los integrantes del Laboratorio de Esteroides que con su estímulo y su compañerismo hicieron posible el "medio" para desarrollar este trabajo de tesis. En particular a la Dra. Alcira Aragonés por sus consejos y su constante apoyo en los momentos difíciles; a la Lic. Nora R. Ceballos por todo lo que me aportó el trabajar en equipo; a la Lic. Claudia B. González por su predisposición a la crítica constructiva.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular por su siempre amable predisposición a colaborar.

A todos los compañeros y profesores del Departamento de Química Biológica que con su ayuda y estímulo han contribuido a la realización de este trabajo. En particular al Lic. Eduardo T. Cánepa; a la Sra. Carmen Aldonatti; a la Lic. Silvia Billi; a la Lic. Silvana Greco; a la Lic. Marta Mazzetti; al Lic. Juan Carlos Monge; a la Dra. María del Carmen Ríos de Molina; a la Lic. Yolanda Sopena; a la Lic. Cristina Taira; a la Lic. Adriana Umansky y a la Dra. Rosa Wainstok de Calmanovici, por su imprescindible afecto y compañerismo.

Al Dr. Gerardo Burton por su interés en mi tema de trabajo, por sus enseñanzas y por la realización de los espectros de RMN y de masas.

Al Dr. Eduardo H. Charreau por sus invalorables su gerencias y opiniones.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por haberme dado el lugar de trabajo.

Al CONICET por haberme otorgado el cargo laboral.

En fin, a todos quienes me estimularon, me ayudaron, me escucharon y me enseñaron para poder concretar el presente Trabajo de Tesis.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

I N D I C E

INTRODUCCION

I.	Esquema Integrativo y Regulatorio de la Aldosteronogénesis.....	1
II.	Oxidaciones en los caminos esteroideogénicos.	6
III.	Ubicación especial de la 18-OH-B a lo largo de este esquema de los caminos metabólicos.....	20
IV.	Química de los esteroides 18-Hidroxiados.....	21
	a) Formas abiertas y cíclicas.....	21
	b) Generalidades sobre formas menos polares de los pregnano esteroides 18-hidroxiados, y en especial de la 18-OH-B.....	24
	c) Producción de formas menos polares en medio ácido.....	26
	d) Producción de formas menos polares en solventes orgánicos.....	28
	e) Dimerización.....	29
V.	Química de la Aldosterona.....	30
VI.	La biosíntesis de la 18-OH-B y de la Aldo.....	32
	a) Secuencia de reacciones.....	32
	b) Rendimientos biosintéticos: la baja capacidad precursora de 18-OH-B.....	35
	c) Mecanismos y co-factores.....	39
	d) Compartimentalización a nivel celular.....	42
VII.	Las zonas de la corteza suprarrenal, sus secreciones y funciones.....	43

VIII.	Importancia de las reacciones espontáneas en la biosíntesis de esteroides.....	47
IX.	Efecto del ACTH sobre la aldosteronogénesis.....	49
	<u>OBJETIVOS</u>	52
	<u>MATERIALES Y METODOS</u> ..	
I.	Formas menos polares de la 18-OH-B en medio HCL.	55
	a) Su formación y análisis por cromatografía en papel.....	55
	b) Su formación y análisis por cromatografía líquida de alta presión.....	56
	c) Correlación entre CP y CLAP.....	57
	d) Estudios de reversibilidad de las formas menos polares de la 18-OH-B.....	58
	e) Estudios estructurales.....	60
	e ₁) Espectros de Resonancia Magnética Nuclear	60
	e ₂) Comparaciones cromatográficas.....	61
	e ₃).....	62
	e ₄) Obtención de 18-Desoxialdosterona radioinerte a partir de 18-Desoxialdosterona-21-Acetato.....	63
II.	Forma menos polar de la Aldosterona en medio HCL.	64
	a) Su formación.....	64
	b) Estudios de reversibilidad de la forma menos polar de la Aldosterona.....	65

c)	Estudios de formación de la forma menos polar de Aldosterona en HCl, con distintas cantidades de reactivo.....	66
d)	Estudios estructurales sobre la forma menos polar de la Aldosterona.....	67
d ₁)	Resonancia magnética nuclear.....	67
d ₂)	Espectrometría de masas.....	68
III.	Cromatografía líquida de alta presión.....	70
a)	CLAP analítica.....	70
1.	Generalidades.....	70
2.	Solventes.....	71
3.	Elución isocrática.....	71
4.	Elución por gradiente.....	72
4A)	Dispositivo Nº 1 para producir. Gradiente de elución.....	72
4B)	Dispositivo Nº 2 para producir. Gradiente de elución.....	72
4C)	Modelo matemático de los dispositivos para Gradientes de elución.....	74
4D)	Cómo se logra regular θ en los dispositivos usados para la obtención de gradientes de elución.....	76
4E)	Comprobación experimental del gradiente de elución.....	77
5.	Flujos.....	77
6.	Procedimiento.....	77
7.	Estudios sobre óptima recuperación.....	79
7A)	Determinación del RC.....	81
7B)	Recuperación Cuantitativa.....	82
b)	CLAP preparativa.....	82
1)	Generalidades.....	82
2)	Fase móvil.....	82
3)	Flujo.....	84
IV.	Generalidades metodológicas comunes a los experimentos de incubación de adrenales de rata.....	85

	a) Animales.....	85
	b) Obtención, preparación y tratamiento del tejido.....	85
	c) Soluciones buffer.....	86
	d) Condiciones de las incubaciones.....	86
	e) Disolución de los precursores.....	87
	f) Agregado de otros compuestos a las incuba- ciones.....	88
	g) Tratamiento de los incubados.....	88
	1) Incubaciones con cuartos de adrenales.....	88
	2) Incubaciones con homogenatos.....	89
	h) Determinación cuantitativa de Aldosterona tritiada.....	90
	i) Aldosterona de la forma menos polar de la Aldosterona: su purificación y cuantificación.....	94
	j) Aldo total.....	99
	k) Forma menos polar de 18-OH-B de R _M 7,18.....	99
	Semicuantificación de otros productos.....	99
	l) Material saponificable con KHCO ₃ (MS).....	101
	m) 18-OH-B forma M.....	101
	n) 18-Desoxialdosterona.....	102
	o) Otras formas menos polares de la 18-OH-B.....	104
	p) Medición de radiactividad.....	105
V.	A) Experimentos sobre capacidad precursora de M y MAC para Aldosterona.....	109
	a).....	109
	b) Tratamiento estadístico.....	110
	B) Experimentos sobre capacidad precursora de M y MAC, incluidos en liposomas, para Aldos- terona.....	111
	a).....	111
	b) Tratamiento estadístico.....	111
	c) Formación de liposomas.....	112
	c ₁) Obtención de grasa adrenal.....	112
	c ₂) Incorporación de los precursores a los liposomas.....	113

	Tratamiento estadístico conjunto.....	114
VI.	Experimentos de dilución de MAC- ³ H con 18-DAL radioinerte.....	116
VII.	Estudios sobre capacidad precursora para Aldosterona de otros precursores.....	118
	a) Otras formas menos polares de 18-OH-B.....	118
	a ₁) Preparación de los precursores.....	118
	b) Material saponificable a 18-OH-B.....	119
	b ₁) Preparación del precursor.....	120
VIII.	Experimentos sobre "Curso de la reacción de producción de Aldosterona a partir de 18-OH-B".	121
	Tratamientos de los incubados con B como precursor.....	124
IX.	Experimentos de Atrapamiento.....	122
	a) Experimento de atrapamiento de 18-OH-B radiactiva a partir de 1,2- ³ H-Corticosterona en la biosíntesis de aldosterona.....	122
	b) Experimento de atrapamiento de 18-Desoxialdosterona radiactiva a partir de 1,2- ³ H-Corticosterona en la biosíntesis de Aldosterona.....	122
	c) Experimento de atrapamiento de 18-Desoxialdosterona radiactiva a partir de 1,2- ³ H-18-OH-B en la biosíntesis de Aldosterona.....	123
X.	Experimentos de Requerimientos para las oxidaciones de 18-OH-B y 18-DAL para dar Aldosterona.	126
	a) Requerimiento de NADP ⁺ o NADPH.....	126
	b) Requerimiento de O ₂	127
XI.	Localización subcelular de las biosíntesis de MS y Aldosterona a partir de 18-OH-B y 18-DAL.....	128
	a) Experimentos previos.....	128
	b) Fraccionamiento subcelular.....	129
XII.	Localización submitocondrial de la biosíntesis de Aldo a partir de B.....	133
	a) Experimentos previos.....	133
	b) Fraccionamiento submitocondrial.....	134

XIII. Experimentos con ACTH.....	139
a) A partir de 18-OH-B.....	139
b) A partir de 18-DAL.....	139
XIV. Drogas y Solventes.....	140

RESULTADOS.

I) Formas menos polares de la 18-Hidroxycorticoste rona.....	143
a).....	143
b) Los estudios estructurales.....	146
II) Forma menos polar de la Aldosterona.....	153
a) Producción e Irreversibilidad.....	153
b) Producción de la forma menos polar de la Aldo sterona a partir de distintas cantidades de es- teroides.....	155
c) Determinación de la estructura de la forma me- nos polar de la Aldosterona.....	157
c ₁) RMN.....	157
c ₂) EM.....	163
III) Capacidad precursora para Aldosterona de 18-OH-B (forma M) y de MAC.....	168
IV) Incubaciones de MAC-tritiada con cantidades cre- cientes de 18-DAL.....	182
V) Curso de reacción para la formación de Aldo a partir de B y de 18-OH-B.....	184
VI) Experimentos de Captura.....	187
VII) Requerimientos para las oxidaciones de 18-OH-B y 18-DAL para dar Aldo.....	191
a) Requerimiento de NADPH.....	191
b) Requerimiento de O ₂	191
VIII) Capacidad precursora para Aldosterona de otros precursores.....	196
a) Formas menos polares de 18-OH-B de R _M 5,26; 6,33 y 7,18.....	196
b) Material saponificable a 18-OH-B (MS).....	196

IX)	Localización subcelular de las biosíntesis de Aldo y de MS.....	201
X)	Localización submitocondrial de la biosíntesis de Aldo.....	209
XI)	Efectos del ACTH.....	213
	<u>DISCUSION</u>	220
	<u>CONCLUSIONES</u>	234
	<u>REFERENCIAS</u>	236

A B R E V I A T U R A S

18-OH-B=	18-Hidroxycorticosterona=4-pregnen - -11 ,18,21-triol-3,20-diona.
Aldo=	Aldosterona=4-pregnen-18-oxo- -11 ,21-diol-3,20-diona.
Forma M=	Forma más polar.
B=	Corticosterona= 4-pregnen-11 ,21- -diol-3,20-diona.
NADPH=	Nucleótido de dihidrotrifosfopiridina.
NADP ⁺ =	Nucleótido de trifosfopiridina.
NADH=	Nucleótido de dihidrodifosfopiridina.
18-OH-DOC=	18-Hidroxi-11-desoxicorticosterona- 4-pregnen-18,21-diol-3,20-diona.
DOC=	11-Desoxicorticosterona=4-pregnen-21- -ol-3,20-diona.
λ =	Longitud de onda.
CGL=	Cromatografía gas-líquido.
EM=	Espectrometría de masas.
IR=	Infrarrojo.
18-DAL=	18-Desoxialdosterona=4-pregnen-21-ol- -3,20-diona-11p,18-óxido.
ATP=	Adenosina-5'-trifosfato.
ACTH=	Adrenocorticotrofina.
CP=	Cromatografía en papel.
Ae=	Actividad específica.
R _M =	Relación de M= distancia recorrida por una sustancia/distancia recorrida por la forma M de 18-OH-B.

CLAP=	Cromatografía líquida de alta presión.
T_R =	Tiempo de retención.
R_f =	Relación de frente= distancia recorrida por una sustancia/distancia recorrida por la fase móvil.
RMN=	Resonancia magnética nuclear.
UV=	Ultravioleta.
TLC=	Cromatografía en placa delgada.
HPTLC=	Cromatografía en placa delgada de alta performance.
FMPA=	Forma menos polar de la Aldosterona.
EI=	Extracto inicial.
MS=	Material saponificable.
V_r =	Volumen de retención.
TCA=	Acido tricloroacético.
MAC=	Suspensión de la forma M de 18-OH-B en HCP, compuesta por el reactivo remanente y 4 formas menos polares de 18-OH-B denominadas R_M 4,33; R_M 5,26; R_M 6,33 y R_M 7,18. Para R_M 4,33, el componente mayoritario, se determinó la estructura de 18-DAL.

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

I) ESQUEMA INTEGRATIVO Y REGULATORIO DE LA ALDOSTERONOGENESIS.

Esta tesis pretende ser un estudio integrado del metabolismo del esteroide 18-hidroxicorticosterona (18-OH-B) con particular énfasis en la biosíntesis de la Aldosterona (Aldo) la hormona sodio-retentora, natural más activa de las conocidas. La 18-OH-B en su doble carácter de hormona y de precursor es tema de estudio del laboratorio del que formo parte desde sus albores en los años 70. Diversas tesis (1) (2) (3) y otras publicaciones (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) dan testimonio de esta continuidad.

Entre las publicaciones merece citarse en primer lugar la de Borrueal y col. (4) sobre biosíntesis de corticosteroides en la foca de Weddell, en cierta manera el origen de un extenso plan de investigación. Se observó, en efecto, en este trabajo que, bajo las condiciones experimentales "in vitro" empleadas, la suprarrenal de la foca no sintetizaba Aldo, sintetizando en cambio cantidades relativamente importantes de su elusivo y hasta hace poco hipotético precursor, la 18-OH-B (11).

Este hecho de observación planteó ya en ese entonces tres preguntas, referidas respectivamente a las

razones fisiológicas de la acumulación de 18-OH-B, a los de la inhibición de la Aldo y al mecanismo y condiciones que modulaban la transformación de 18-OH-B a Aldo; o sea cuáles serían los mecanismos y las condiciones bajo las cuales la 18-OH-B se transformaría a Aldo, cuáles las que impedirían esta transformación y las causas mecanísticas para estas modificaciones.

Las dos primeras preguntas darían lugar a una línea fisiológica que demostró para la 18-OH-B un papel especializado en el transporte de iones hidronio hacia la luz del nefrón (8) (9). El esteroide hidroxilado, probablemente bajo su forma M comunmente aislada (ver más adelante), sería una de las hormonas de la corteza suprarrenal involucrada en la homeostasis ácido-base ya que la glándula interviene en dicha regulación en forma integrada, con todas sus hormonas (12), y la 18-OH-B intervendría en la eliminación de protones sin necesidad absoluta de retener Na^+ (8). Una especie pulmonada y anfibia como la foca, que además posee un hábitat marino, no requeriría retener este catión sino que debería eliminar protones acumulados durante los períodos de apnea, sin que esta eliminación dependa de un intercambio con iones Na^+ . Para una mayor explicación de estos requisitos véase por ejemplo (13).

Es la tercer pregunta sin embargo, aquélla que se refiere a condiciones y mecanismos de biosíntesis de la Aldo, la que posee un contenido más inmedia -

tamente relacionado con la endocrinología molecular y con los caminos biosintéticos de los esteroides adrenales.

Si se representan, en efecto, las fórmulas planas de los últimos eslabones presuntos de la biosíntesis de la Aldo, aquéllos que se encuentran supuestamente entre Corticosterona (B) y el mineralocorticoide (Figura 1), uno se encuentra con que los dos metabolitos oxidados en el Carbono angular 18 admiten varias formas tautoméricas. Es bien sabido que las formas abiertas de estos dos esteroides no son estables (Ver por ejemplo (14) (15)). Tanto los antiguos métodos de IR (16) (17) como los modernos que utilizan Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y de ^{13}C (15) (18) y también los métodos de Espectrometría de masas (6) demuestran la predominancia de las formas hemiacetálicas para la 18-OH-B (19) y para la Aldo (20).

Se habrá observado que desistí de trazar flechas verticales en este esquema, y ello por una razón obvia: mal pueden ser precursores de los metabolitos de mayor estado de oxidación, los correspondientes a la Aldo, los metabolitos del estado de oxidación intermedia, puesto que el equilibrio entre estos últimos se halla desplazado hacia formas cuya ciclización es opuesta a la de las formas también cíclicas más estables de la Aldo.

Una hipótesis temprana de este (11) y otros laboratorios (21) admite que estas ciclizaciones opuestas

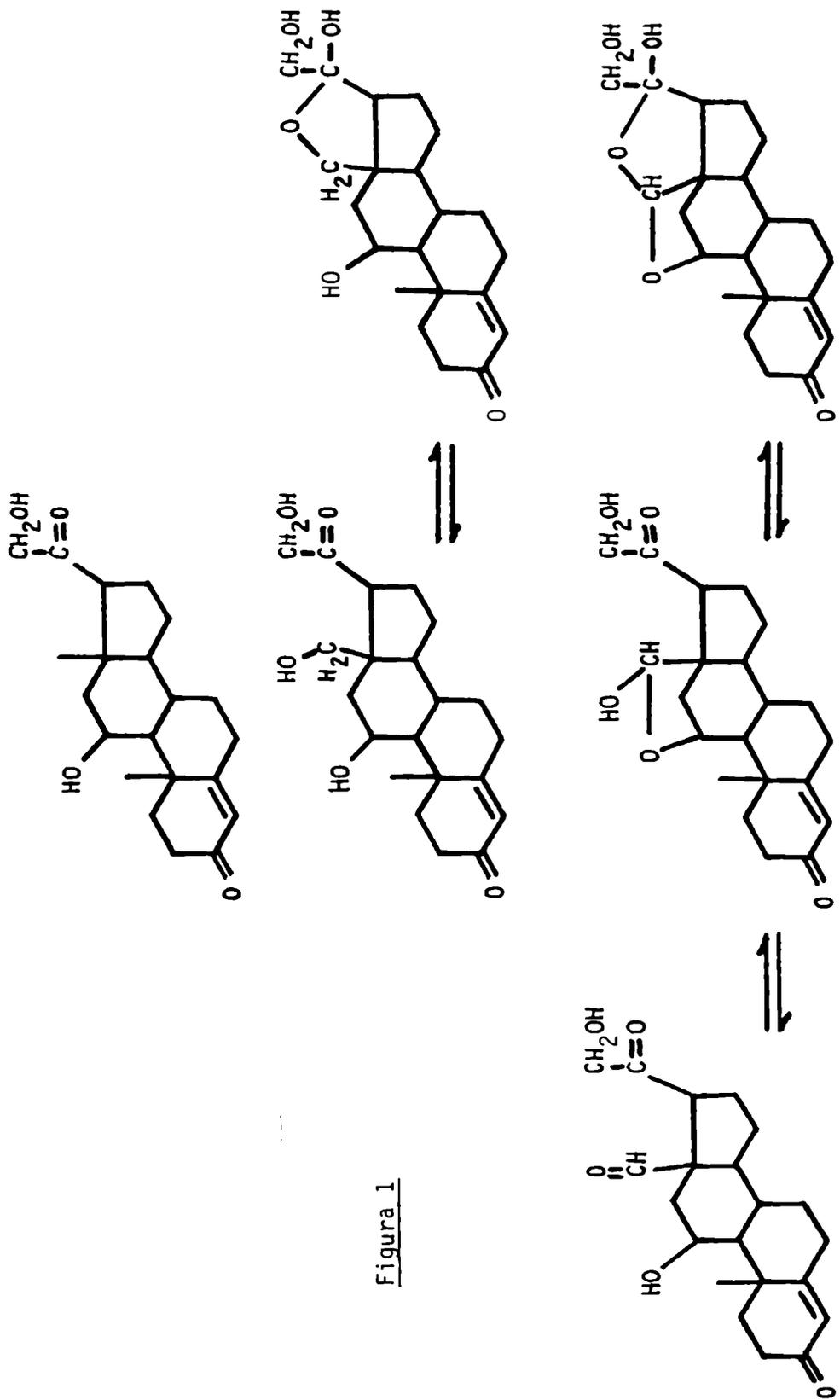


Figura 1

podrían ser de algún modo responsables de la falta de precursoriedad de la forma comunmente aislada de 18-OH-B para el mineralocorticoide. Esta hipótesis se completó con otras, ya propias de nuestro laboratorio, según las cuales podrían existir condiciones que permitieran desplazar los equilibrios de la 18-OH-B hacia buenas formas precursoras y que en aquellas condiciones y entre estas noveles formas habría que buscar tanto los mecanismos para la biotransformación de 18-OH-B a Aldo (5) (11) como las condiciones para la regulación de esta transformación (22).

Los capítulos de Introducción que siguen tratarán en detalle cada uno de los eventos moleculares enunciados a vuelo de pájaro en los párrafos anteriores. En los resultados se analizarán luego las particulares formas de la 18-OH-B que resultan ser buenos precursores, se describirán los métodos que llevan a su separación y a la elucidación de sus estructuras y se ahondará en las condiciones fisicoquímicas (pH, concentración iónica) y bioquímicas (presencia de enzimas, de cofactores y de trofinas) óptimas para su transformación a Aldo.

En la discusión se abrirán juicios sobre los posibles mecanismos de esta transformación y se emitirá una hipótesis sobre regulación de hormonas esteroideas a través de transiciones entre formas isoméricas de moléculas precursoras pequeñas.

II) OXIDACIONES EN LOS CAMINOS ESTEROIDOGÉNICOS.

A partir de pregnenolona surgen los caminos esteroideogénicos que llevan a compuestos más oxidados: la aldosterona (Figura 2), el cortisol (Figura 3) y los estrógenos (Figura 4). Aunque estos caminos son bien conocidos desde hace decenios resumiré las características más notorias de las reacciones involucradas, de los metabolitos finales y de los eslabones intermedios, tratando de generalizar, dentro de lo posible, correlaciones entre eventos y estructuras moleculares por un lado y propiedades biológicas así como requerimientos homeostáticos por el otro.

Existen a través de estos caminos tres tipos de reacciones, dos de naturaleza oxidativa (hidroxilaciones y deshidrogenaciones) y una de naturaleza reductiva. Estas reacciones llevan a esteroides que pueden dividirse en cinco categorías:

Categoría A:

Precusores puros a los que hasta ahora no se les conoce función hormonal. Ejemplo: pregnenolona (Figura 2).

Categoría B:

Eslabones que son, o pueden llegar a ser precursores y/u hormonas. Ejemplos: progesterona (Figura 2), Corticosterona (Figura 2), testosterona (Figura 4).

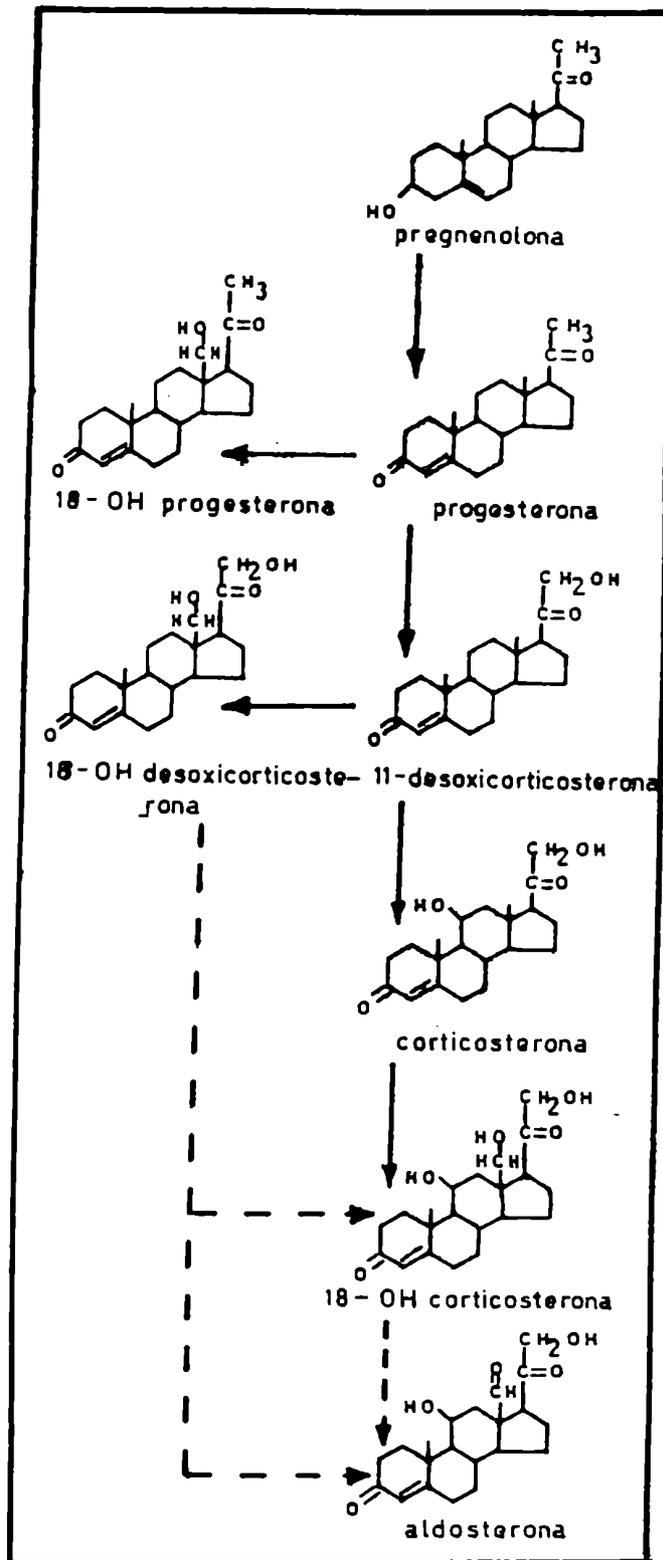


Figura 2: Caminos biosintéticos que llevan a Aldosterona.

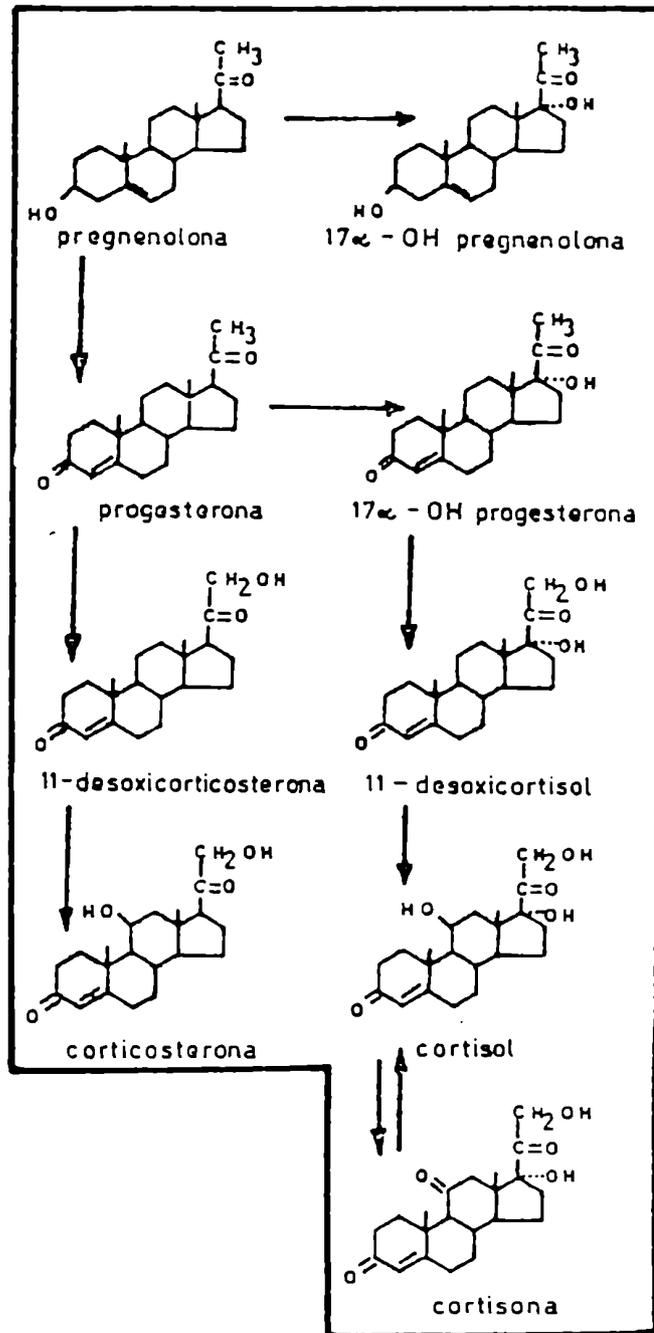


Figura 3: Caminos biosintéticos para glucocorticoides.

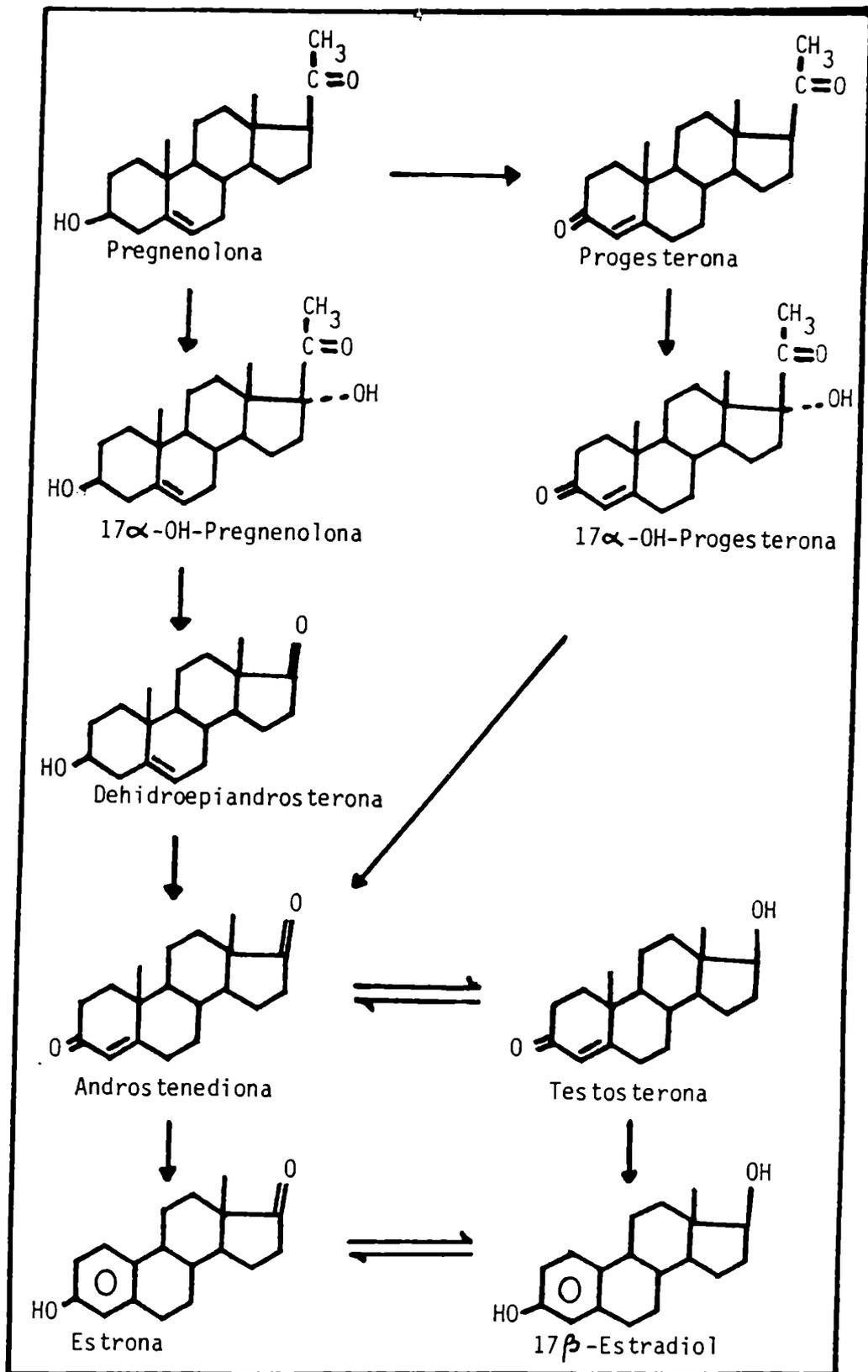


Figura 4: Caminos biosintéticos que llevan a Andr6genos y Estr6genos.

Categoría C:

Esteroides de reserva con poca o ninguna actividad hormonal per se pero fácilmente reversibles a esteroides hormonalmente activos. Ejemplos: Cortisona (Figura 3), Androstenediona (Figura 4).

Categoría D:

Hormonas que se encuentran al final de un camino, que no son precursores de otras hormonas y a lo más se metabolizan a catabolitos inactivos. Ejemplos: Aldo (Figura 2), Estrógenos (Figura 4), Cortisol (Figura 3).

Categoría E:

Estos catabolitos inactivos.
Ejemplos: tetrahidroaldosterona, adrenosterona y tetrahidrocortisol.

Los esteroides que integran cada una de estas divisiones se hallan sujetos continuamente a evaluaciones críticas. Un ejemplo clásico es el papel catabólico que se le asignó a la 5 α -dihidrotestosterona hasta hace aproximadamente 20 años, la que ahora es considerada como la hormona androgénica más activa de las conocidas (23). De tal modo, si bien las categorías siguen conceptualmente válidas sus integrantes se hallan expuestos a continuos cambios de ubicación debido a la interpretación de nuevos hechos experimentales.

Es casi redundante decir que los avances a lo

largo de los caminos metabólicos llevan a eslabones cada vez más oxidados y que finalmente terminan en los esteroides pertenecientes a la categoría de hormonas "puras" (Categoría D).

En general, estos esteroides que se encuentran al final de los caminos son también las hormonas más activas, o sea las que en menores concentraciones actúan. Sin embargo se trata también de las menos plásticas, o sea carentes de rol precursor. Es el caso de la Aldosterona, altamente activa a nivel de nmoles/litro (24) y absolutamente carente de plasticidad, así como de los estrógenos, los que en muchos aspectos se asemejan a la Aldosterona.

La peculiar ubicación de la 18-hidroxicorticosterona en este esquema dependerá de la demostración de su carácter precursor para el mineralocorticoide.

¿Cómo intervienen las 3 clases de reacciones que hemos visto en la biosíntesis de cada una de estas categorías de esteroides?. Los avances a través del camino metabólico en general se consiguen por hidroxilaciones. Estas oxidaciones se caracterizan por ser irreversibles, por dar lugar a esteroides con capacidad hormonal y precursora (Categoría B) así como hormonal pura (Categoría D); por necesitar oxígeno molecular; y por usar nucleótidos reducidos (NADPH) que se oxidan junto al esteroide.

La irreversibilidad se logra a través de una ca-

dena oxidativa cuyo último eslabón es el citocromo P-450, único eslabón de la cadena que puede aprovechar el oxígeno molecular (Figura 5).

La reacción general para las hidroxilaciones se representa en la Figura 6. En ella se puede ver que, tal como se comentó antes, el esteroide y el nucleótido se oxidan, constituyendo la otra hemirreacción la reducción del O_2 a H_2O y al grupo oxhidrilo del esteroide. De este modo el requerimiento simultáneo de O_2 y de NADPH será un hecho experimental que permitirá asegurar un mecanismo de hidroxilación a una dada oxidación. El NADPH, necesario para la hidroxilación, en general no atraviesa con facilidad las membranas de las distintas organelas celulares (25). Es así como en las hidroxilaciones mitocondriales el NADPH suele generarse, experimentalmente, por el agregado de intermediarios del ciclo de Krebs; o bien por el agregado de malato y $NADP^+$. En el primer caso se activa el funcionamiento del Ciclo y se genera NADH que por acción de la enzima transhidrogenasa-ATP dependiente se transforma en NADPH (26) (27). En el 2º caso el malato se oxida a piruvato por acción de la enzima málica mientras que el $NADP^+$ se reduce a NADPH (28) (29).

El citocromo P-450 que produce la reducción del oxígeno molecular (Figura 5) es específico para las

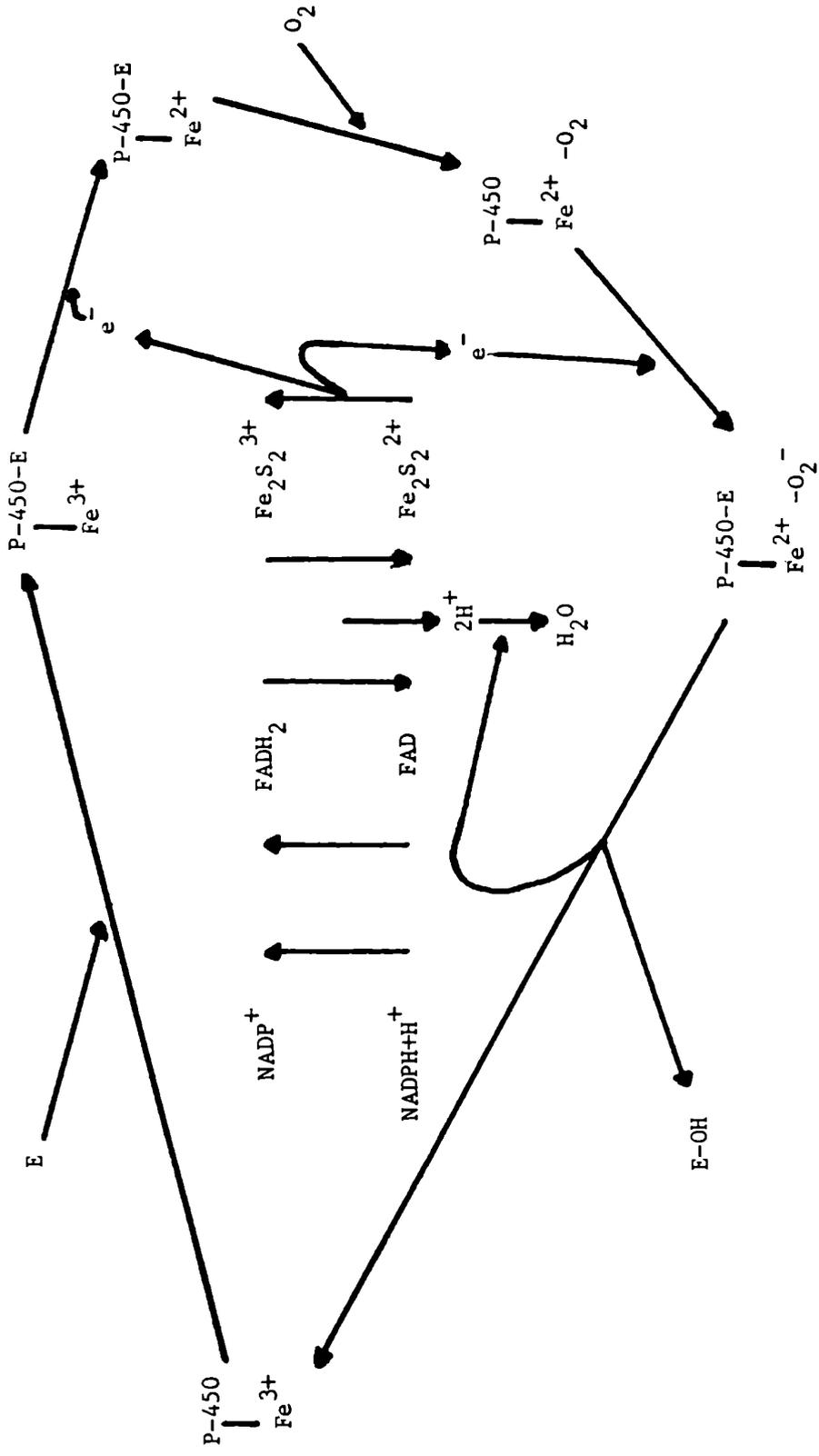


Figura 5: Cadena hidroxilante del citocromo P-450.

E: esteroide a hidroxilar.

E-OH: esteroide hidroxilado.

posiciones a hidroxilar. En efecto, han sido purificados (30-31) o por lo menos descritos (32) varios tipos de citocromo P-450 en tejidos esteroideogénicos: el citocromo P-450-11 β responsable en la mitocondria adrenal de las hidroxilaciones en las posiciones C-11 y C-18 de pregnano esteroides (30) (31) (33) y en la posición C-19 de la 18-OH-DOC (34) (35); el citocromo P-450-SCC también mitocondrial al cual se une el colesterol para hidroxilarse en las posiciones C-20 y C-22 y luego sufrir la pérdida de la cadena lateral (C-22 a C-27) (36) (37) (38); el citocromo P-450-microsomal de adrenal para la hidroxilación en las posiciones C-17 y C-21 (27) (39) (40) (41); el citocromo P-450 también microsomal para la hidroxilación en la posición C-17 de pregnano esteroides seguida de la pérdida de la cadena lateral para dar lugar a los andrógenos (42) (43); el citocromo microsomal P-450-AROM (aunque también se lo ha hallado en mitocondrias de placenta (44) (45)) responsable de las hidroxilaciones en la posición C-19 de los androstanos para dar lugar a los estrógenos (32) (46). Los citocromos P-450-11 β y SCC suelen ser llamados en conjunto P-450-S (47).

Con respecto al citocromo P-450-11 β se han intentado separar las actividades enzimáticas para las hidroxilaciones en las posiciones C-11 y C-18 con resultados negativos (30). En efecto, las evidencias acumuladas apoyan la existencia de una sola proteína



Figura 6: Reacción Gral. para las hidroxilaciones
 $\text{E} \equiv \text{CH}$: núcleo esteroide y su carbono a
hidroxilar.

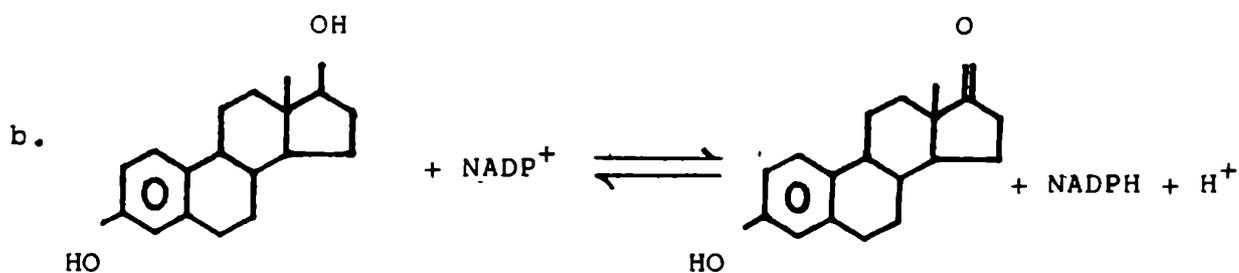
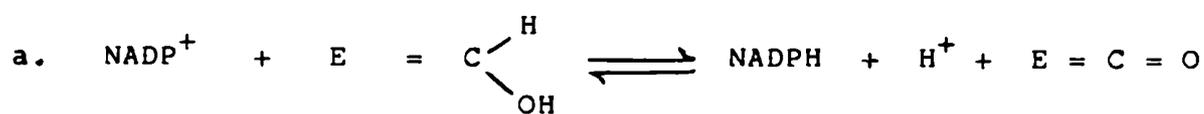


Figura 7:

a. Reacción Gral. para las deshidrogenaciones

$\text{E} = \text{C} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{OH} \end{matrix}$: núcleo esteroide y su carbono a
deshidrogenar.

b. Reacción de deshidrogenación sobre Estradiol
para dar Estrona.

responsable de ambas hidroxilaciones: en la electroforesis en gel de poliacrilamida del citocromo P-450-11 β se obtiene una sola banda (30); a través de diversos pasos de purificación la relación "actividad de 11 β -hidroxilación/actividad de 18-hidroxilación" se mantiene constante (30); el análisis de la estructura primaria del citocromo P-450-11 β da un sólo aminoácido terminal (48); la reacción sobre gel de agarosa por difusión doble entre el citocromo P-450-11 β purificado que contiene ambas actividades enzimáticas y su antisuero obtenido de conejo da una sola banda de precipitación (48).

Por otro lado Momoi y col. (49), estudiando la actividad del citocromo P-450-11 β en porcinos, bovinos, cobayos, conejos y ratas, encontraron que la actividad de 11 β -hidroxilación y de 18-hidroxilación sobre 11-desoxicorticosterona (DOC) es máxima en la rata, mientras que la actividad de 11 β -hidroxilación sobre 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona es mínima en la misma especie. Esto indicaría que existe diferente distribución de las actividades hidroxilásicas dependiente de la especie animal.

Unas palabras sobre otros criterios experimentales para el estudio de la especificidad de un citocromo P-450 dado: La unión del esteroide al citocromo P-450 se puede detectar por un corrimiento en la banda de Soret de la proteína hémica. La primera investi

gadora que realizó esta importante observación fue Naramsinhulu (50). Los resultados fueron posteriormente confirmados (51) (52) (53). La interacción del ligando (sustrato) con el citocromo resulta en cambios característicos en los λ máx y λ mín del espectro de absorción (54). Los cambios obtenidos luego de la unión del ligando al citocromo P-450 con respecto a la proteína libre han sido clasificados en dos tipos: El espectro de tipo I con un máximo a 388 nm y un mínimo a 420 nm producido por un cambio desde el estado de spin inferior al estado de spin superior en los electrones de los orbitales de valencia del átomo de Fe hémico (55); y el espectro de tipo II con un máximo a 420 nm y un mínimo a 390 nm, indicativo de un cambio hacia el estado de spin inferior el cual puede ser causado por la interacción del Fe hémico con una base nitrogenada (56). La aparición o no de tales cambios espectroscópicos indica entonces la existencia o no de interacción entre los esteroides y el citocromo P-450.

Así se ha visto que el citocromo P-450 de testículo se une preferencialmente a pregnano esteroides (57) y que el de placenta une C-19 esteroides (58). Esto indicaría también la existencia de varios tipos de citocromo P-450 los cuales unirían al tipo de esteroides que el tejido específicamente metaboliza (54).

Las enzimas asociadas a la función de hidroxilación del citocromo P-450 se denominan oxidasas de función mixta (59) (60) o hidroxilasas (22) (60) (61). Estas enzimas tienen compartimentalizadas sus actividades a nivel de órganos y a nivel celular. Por ejemplo la actividad 21-hidroxilásica no se halla ni en ovario ni en testículo pero sí se halla en adrenal (62). Con respecto a esta última glándula cabe mencionar que posee todas las actividades hidroxilásicas o sea las de las gonadas y las propias características, aunque en distinta proporción en cada una de las zonas anatómicas (47) (Ver más adelante).

El 2º tipo de oxidación es el de la deshidrogenación, reacción NADP^+ dependiente que, dado el carácter oxidante del co-factor, puede realizarse en medio exento de O_2 (anaeróbico). Son ejemplos típicos la reacción de Cortisol a Cortisona; de Corticosterona a 11-dehidrocorticosterona (compuesto A); de Testosterona a Δ -4-androstenediona; de estradiol a estrona. La reacción general, junto a algunos de estos ejemplos, se halla representada en la Figura 7. Las características de este tipo de reacciones son las siguientes: consisten en reacciones reversibles entre alcoholes y cetonas; el compuesto oxidado, es por lo general el compuesto biológico menos activo (al revés de lo que ocurría en las hidroxilaciones); a este compuesto oxi-

dado se le asigna un papel de sustancia de reserva, por lo menos en los ejemplos anteriores. Es así que la Cortisona mucho menos afín por los receptores de las glucocorticoides que el Cortisol, constituye una forma de reserva glucocorticoidea durante el desarrollo fetal. A medida que el feto se desarrolla el equilibrio Cortisona \rightleftharpoons Cortisol se desplaza hacia la derecha, compitiendo además los receptores del Cortisol en forma creciente por el sustrato con la deshidrogenasa.

Hay una notable excepción en estas deshidrogenaciones: la que se produce a la altura de la isomerización del doble enlace Δ -5-6 a doble enlace Δ -4-5 con simultánea deshidrogenación del oxhidrilo en posición C-3; por ejemplo la transformación de Pregnenolona a Progesterona, Figura 2. Esta reacción es irreversible (Ver sin embargo Rosner y colab. (63)) y su segundo término, a diferencia del primero, es hormonalmente activo.

III) UBICACION ESPECIAL DE LA 18-OH-B A LO LARGO DE ESTE ESQUEMA DE LOS CAMINOS METABOLICOS.

Su doble carácter de hormona y precursor colocaría a la 18-OH-B en la categoría B de la clasificación de esteroides hecha en la Sección anterior. Es decir que la 18-OH-B es un eslabón dentro de los caminos metabólicos que es precursor y hormona.

A lo largo de esta tesis se demostrarán, sin embargo, las diferencias entre este precursor-hormona-18-hidroxiado y otros precursores-hormonas tales como Progesterona, Andrógenos y la misma Corticosterona que no dependen para su cambio de carácter de alteración o transición entre estructuras moleculares.

IV) QUIMICA DE LOS ESTEROIDES 18-HIDROXILADOS.

a) Formas abiertas y cíclicas.

Aquellos esteroides que poseen un grupo OH en la posición C-18 pueden reaccionar con grupos carbonilos cercanos, siempre que el factor estérico favorezca dicha reacción. Los esteroides que se hallan en esta situación son los derivados del pregnano 18-OH-Progesterona; 18-OH-11-desoxi-Corticosterona; (18-OH-DOC) y 18-OH-Corticosterona (18-OH-B).

Como ya se mencionó, estas moléculas no se encuentran en su forma estructural abierta (Figuras 8 y 9) sino que el grupo OH de la posición C-18 puede reaccionar con el grupo carbonilo de la posición C-20 formando un puente hemiacetalico $C_{18} - O - C_{20}$, que da lugar a las correspondientes estructuras cíclicas (Figuras 8 y 9) (18) (6) (19). El equilibrio entre formas abiertas y formas cíclicas se halla en todas ellas grandemente desplazado hacia la derecha puesto que las formas cíclicas son más estables.

La característica de estas formas cíclicas, no observable en la estructura plana, es que el grupo OH que se ha formado en C₂₀ a raíz de la existencia del puente hemiacetalico se halla más expuesto que su antecesor de la posición C-18 de la forma

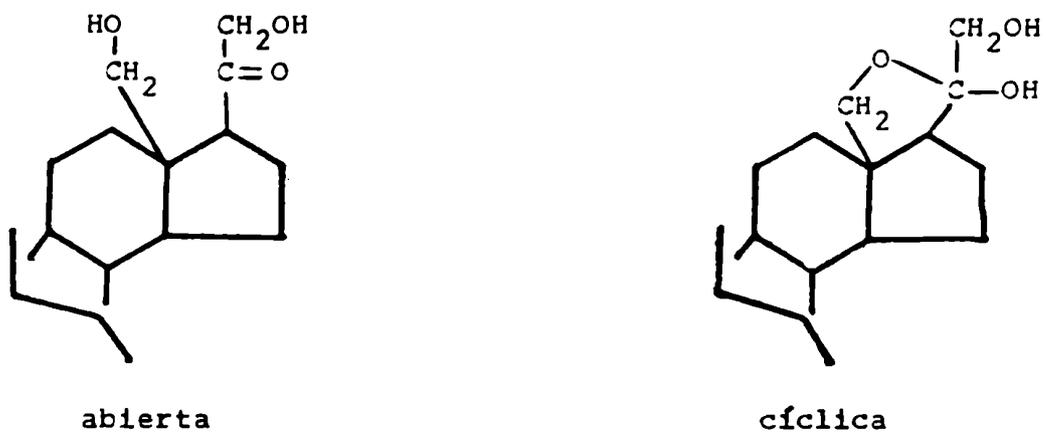


Figura 8: Formas abierta y cíclica de un esteroide 18-hidroxilado.

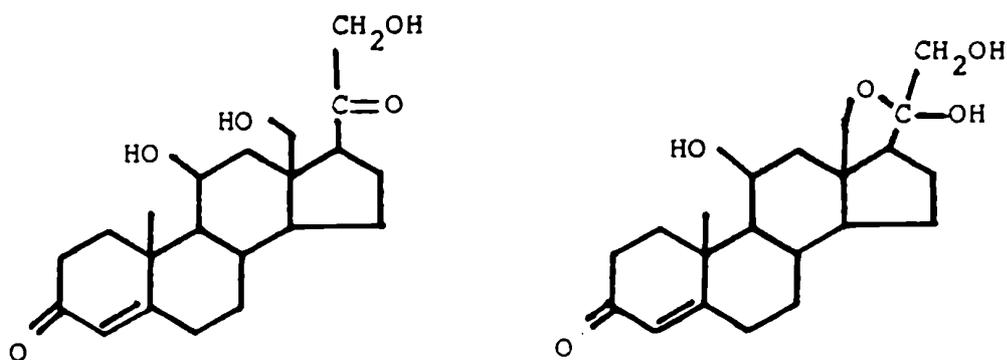


Figura 9: Formas abierta y cíclica para la 18-hidroxi corticosterona.

abierta (6). Como consecuencia las formas cíclicas son más reactivas y algo más polares. De todos modos, tanto formas abiertas y cíclicas son mucho más polares que las derivadas de estas últimas en las que los oxhidrilos se hallan funcionalizados (Ver más adelante). Por ésto las formas no derivatizadas se denominan formas M (de "More polar"). En cromatografía en papel ambas formas M no se resuelven por lo que se presentan como un pico único de movilidad intermedia entre la forma cíclica y la forma abierta.

La existencia de ambas formas M (abierta y cíclica) en solución ha sido comprobada por la formación de diacetatos (64); por la formación de trimetilsililderivados (65); por reacción con azul de tetrazolio más o menos retardada (66); por CGL-EM (65) y por EM (6) (67). Estos son métodos dinámicos (destructivos) que desplazan el equilibrio hacia las formas susceptibles de ser derivatizadas y por consiguiente dan una idea sobre la existencia de ambas formas pero no sobre la proporción relativa. Aunque en el caso de las reacciones colorimétricas como la del Azul de tetrazolio propia de compuestos con cadenas α -cetólicas intactas, uno puede inferir de la velocidad de reacción (la velocidad con la que aparece el color) si las correspondientes moléculas se hallan más bien con la cadena in-

tacta (o sea abierta); o hemiacetálica en cuyo caso la reacción es más lenta. Finalmente los métodos estáticos no destructivos tales como las Espectroscopías de IR y de RMN sí permiten saber la proporción relativa de cada una de las formas, ya que no modifican el estado de equilibrio. Por ejemplo, estudios de IR de 18-OH-B (64) y 18-OH-DOC (16) (68) (69) no pudieron demostrar un pico de absorción a 1700 cm^{-1} característico de compuestos con grupos carbonilos libres no conjugados. Estos grupos existen en la posición C-20 de las formas abiertas de estos 18-hidroxiesteroides. Sin embargo en uno de esos estudios (16) se vió una pequeña absorción a ese número de onda la cual se evidenció como un pequeño hombro. De este modo, en el equilibrio, la forma abierta está presente solamente como un componente menor. Los estudios de RMN de 18-OH-DOC (70) (20) y de 18-OH-B (18) confirman los resultados de IR, ya que sólo se evidencia el grupo carbonilo de la posición C-3, no apareciendo señales del de la posición C-20 de la forma abierta.

- b) Generalidades sobre formas menos polares de los pregnano esteroides 18-hidroxilados, y en especial de la 18-OH-B.

El primer investigador en evidenciar la exis

tencia de formas menos polares producidas espontáneamente o por estacionamiento en ciertos solventes orgánicos de la 18-OH-11-desoxi-Corticosterona fue Domínguez (71) quien abre diversas hipótesis sobre la naturaleza de estos compuestos. El primero en evidenciar la producción de tales compuestos en medio ácido fue Kondo (14) quien postuló la formación de un dímero; y luego Kirk (72) propuso la formación en medio ácido de anhídridos. En este laboratorio Damasco y Lantos en 1975 (5) demuestran buena precursoriedad para lo que ellos consideran en ese momento forma única poco polar de la 18-OH-B estacionada en disolución metanólica y años más tarde Aragonés y col. (6) estudiaron sistemáticamente la existencia de varias formas poco polares con dilucidaciones tentativas estructurales para algunos de ellos. Actualmente lo que se conoce sobre estas formas es lo siguiente: como consecuencia de la formación del puente hemiacetalico entre las posiciones C-18 y C-20 aparece en la forma cíclica un OH sustituyente que confiere a la molécula no sólo mayor polaridad sino también mayor reactividad. En efecto, posiblemente por su cercanía al puente oxígeno (Figura 8 y 9) y la consiguiente labilidad del H del OH en C-20, el compuesto cíclico tanto de 18-OH-DOC como de 18-OH-B posee carácter ácido. Una de las consecuencias de

esa reactividad es la formación reversible en soluciones alcohólicas de un derivado 20-alcohoxilado (6). Esta reacción ocurre a temperatura ambiente y con una velocidad que disminuye con el largo de la cadena alcohólica (6). La reacción general para la 18-OH-B está representada en la Figura 10.

A partir de 18-OH-DOC se ha descrito por RMN la formación de derivados 20-metoxilados (70). Estos mismos derivados han sido detectados por EM (15).

La formación de estos derivados 20-alcohoxilados de las formas cíclicas de los pregnano esteroides 18-hidroxilados se produce cuando los medios alcohólicos se hallan ligeramente ácidos (Ver más adelante). En cambio, el producto de la misma polaridad en el sistema cromatográfico en papel Bush B 5 (73) (R_M 4.33) pero que se produce en medio alcohólico rigurosamente neutro es distinto, no conociéndose aún su estructura.

c) Producción de formas menos polares en medio ácido.

Los esteroides 18-hidroxilados pueden producir formas menos polares, también en medio ácido (6) (19) (74). Tal vez las más estudiadas sean las correspondientes a la 18-OH-B. Hasta la realización de la presente tesis se sabía que la 18-OH-B cro-

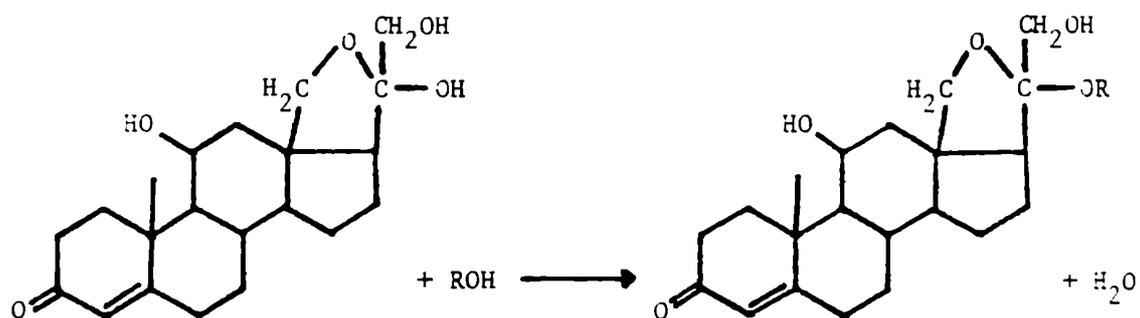


Figura 10: Obtención del derivado 20-alcohexilado de 18-OH-B (M). R: grupo alquilo.

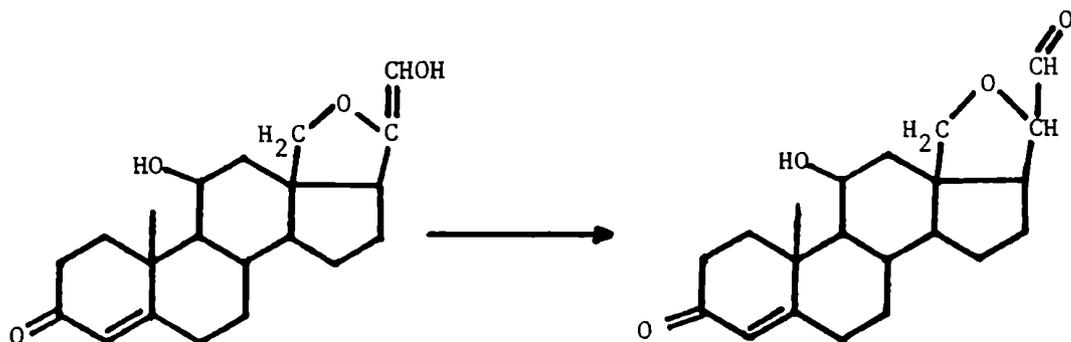
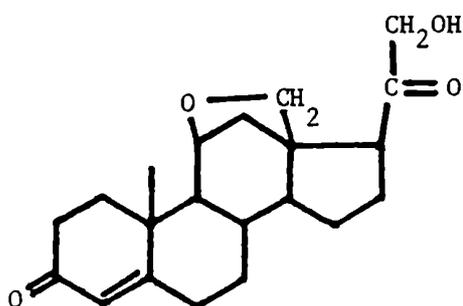


Figura 11: Estructuras propuestas por Aragonés y col.(6) para el principal componente del MAC (R_M 4,33).

matográficamente homogénea producía en medio ácido 4 formas menos polares, separables por cromatografía en papel (sistema Bush B5 (73)) cuyos valores de R_M (distancia recorrida por el compuesto/ distancia recorrida por la 18-OH-B forma M) son 4.33; 5.26; 6.33 y 7.18 (6). De todas estas formas menos polares, la más abundante resultó siempre ser la de R_M 4.33 (6) (19). Sobre esta forma se realizaron estudios por EM los cuales no permitieron concluir o dejaron duda sobre si el compuesto de R_M 4.33 fuera 4-eno-21-OH-3,20-diona-11,18-oxido-pregnano (18-DAL) o 4,20-dieno-11,21-dioH-3-ona-18,20-oxido-pregnano, pudiendo eventualmente darse una mezcla de ambas (Figura 11).

d) Producción de formas menos polares en solventes orgánicos.

El estacionamiento de 18-OH-B en distintos solventes orgánicos tales como acetona, benceno, cloroformo, etc.... (2) (75) (76) produce formas menos polares cuya estructura no es conocida. Se postula que la producción de estas formas podría deberse a la acidez de los solventes orgánicos, a la posibilidad de éstos de formar uniones tipo puente de hidrógeno, o de liberar radicales (75).

El caso especial de los alcoholes como sol-

ventes orgánicos ya fue tratado antes. Podría solamente volver a decirse que los compuestos formados en medio alcohólico rigurosamente neutro son de estructura desconocida y diferentes a los producidos en medio alcohólico con trazas de hidrogeniones, los cuales son 20-alcohoxiderivados, aunque podrían estar en presencia de otras formas aún no determinadas.

e) Dimerización.

La 18-OH-B formada a partir de B, por hidroxilación microbiológica, ha sido aislada del medio de cultivo como un dímero, del cual se sugirió que estaba formado por dos monómeros unidos por sus posiciones C-20 y C-21 (14). La dimerización de 18-OH-B también fue postulada por Damasco y Lantos (5) usando Sephadex LH-20, luego de mantener en solución al esteroide.

En cuanto a 18-OH-DOC, Genard y col. (70) describieron la formación de un dímero en metanol y en dimetilsulfóxido.

V) QUIMICA DE LA ALDOSTERONA.

En la Aldosterona (Aldo) el grupo carbonilo de la posición C-18 puede reaccionar con el grupo OH sustituyente de la posición C-11, por medio de una reacción similar a la que ocurre en la 18-OH-B entre el carbonilo de C-20 y el OH de C-18. De esta manera se produce un puente hemiacetalico C-11 — O — C-18, dando lugar a la forma monocíclica de la Aldo (Aldo-mc) (Figura 12).

Como consecuencia de la formación del puente hemiacetalico en la Aldo-mc aparece un OH sustituyente de la posición C-18 (Figura 12). Este grupo OH se encuentra ahora en una posición similar al homólogo de la 18-OH-B (Figura 9), por lo que puede reaccionar con el carbonilo de la posición C-20 formándose un ciclo C-18 — O — C-20, y dando lugar a la Aldo bicíclica (Aldo-bc) (Figura 12).

En solución existen las tres formas de la Aldo: abierta, mc y bc, siendo las dos últimas las mayoritarias (20) (77).

En el presente trabajo de tesis se aisló y caracterizó otra forma para la Aldo, en equilibrio con las anteriores, que consistió en un dímero (78).

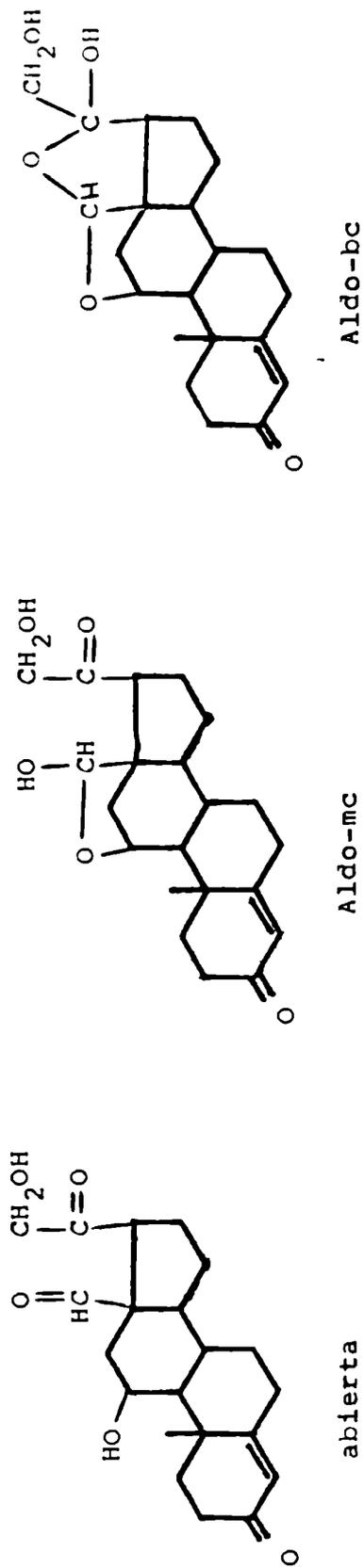
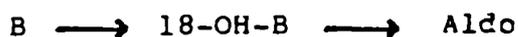


Figura 12: Distintas formas monoméricas de Aldosterona en solución: abierta; monocíclica (Aldo-mc) y bicíclica (Aldo-bc).

VI) LA BIOSINTESIS DE LA 18-OH B Y DE LA ALDO.

a) Secuencia de reacciones.

El metabolismo de B hacia esteroides activos involucra la oxidación del grupo metilo de la posición C-18. El producto final de este mecanismo biosintético rinde Aldo, esteroide que en su forma abierta tiene un grupo aldehído en la misma posición C-18 (Figura 12). Tal oxidación involucra 4 equivalentes (4 electrones) por lo que es dable pensar que deba existir como intermediario del paso de B a Aldo, el esteroide que posea en la posición C-18 un grupo oxhidrilo. Este último esteroide no es más que la 18-OH-B. Por lo tanto, como inicialmente se propuso (Figura 2) se puede escribir (79):



Esta secuencia es avalada por estudios de captura de intermediarios realizados por Vecsei (80) y Kojima y col. (81)(82). A parte de este camino esteroideogénico principal para la biosíntesis de Aldo, Müller (83) propuso un camino alternativo, el cual se halla representado en la Figura 13.

Por otro lado, Neher (84) propuso un esquema más general representado en la Figura 14, el cual incluye las vías metabólicas de Müller (Z de Neher equivalente a 11-desoxialdosterona de

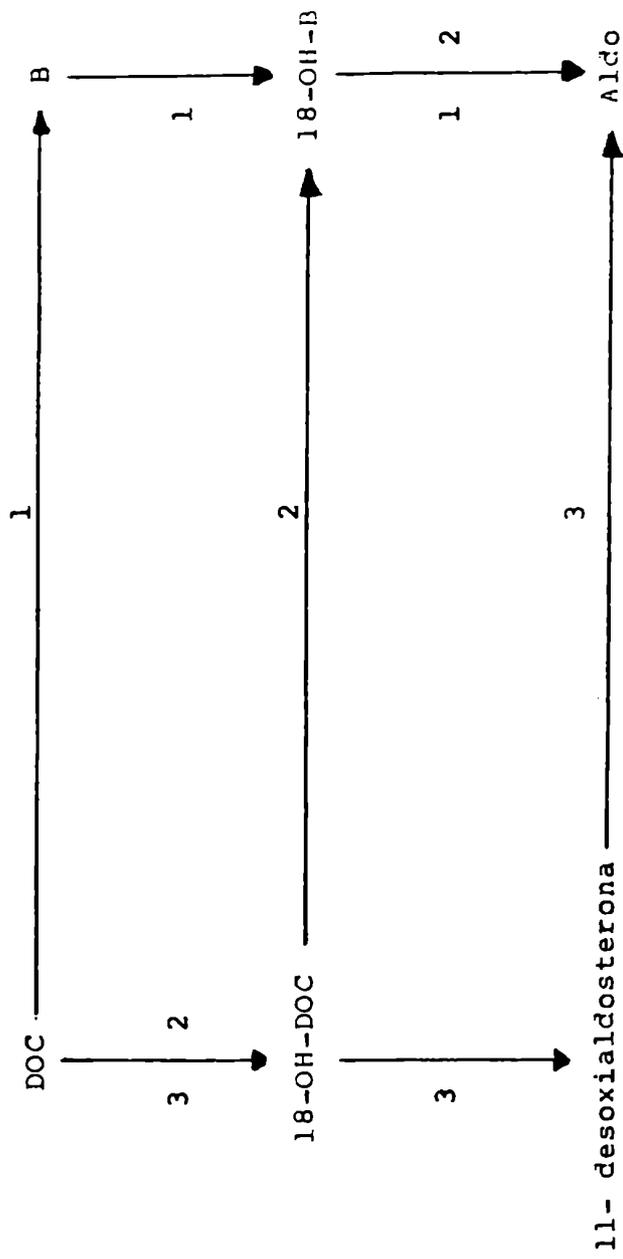


Figura 13: Camino alternativo propuesto por Müller (83) para la biosíntesis de Aldo. DOC = 11-desoxicorticosterona.

Camino 1 = comprobado.

Caminos 2 y 3 = posibles alternativos.

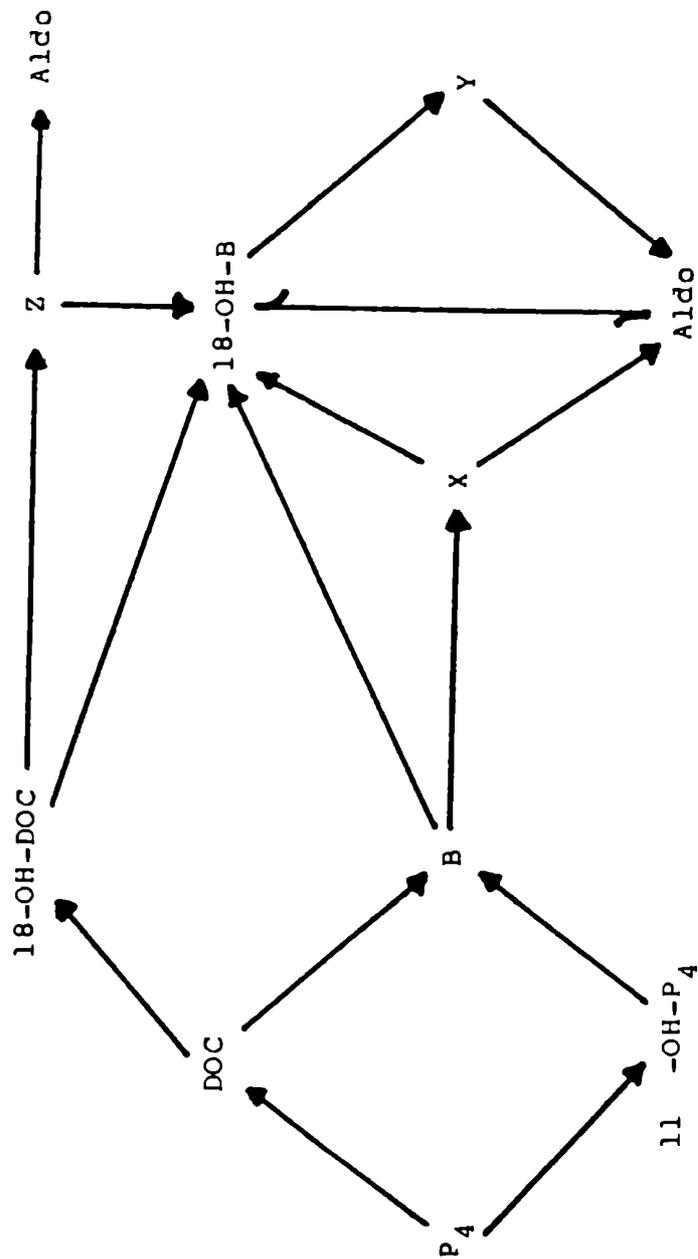


Figura 14: Caminos generales propuestos por Neher (84) para la biosíntesis de Aldo. DOC = 11-desoxicorticosterona; P₄ = progesterona; B = corticosterona; X, Y y Z intermediarios desconocidos.

Müller).

Finalmente, Ulick (85) demostró, en interre-
nales de sapo, que 18-DAL era mejor precursor para
Aldo que 18-OH-B, aunque no halló que aquel este-
roide se produjese como intermediario, a partir
de algún precursor conocido.

b) Rendimientos biosintéticos: la baja capacidad pre-
cursora de 18-OH-B.

Al incubar B tritiada con tejido adrenal
los rendimientos obtenidos para 18-OH-B oscilan
entre el 1 y el 12% (79). Para Aldo los valores
informados se encuentran entre el 5 y el 26%
(79) (7).

Por otro lado, según datos de la literatu-
ra, el rendimiento de Aldo a partir de 18-OH-B
equivale a valores entre 1/81 y 1/17 del rendi-
miento a partir de B (79) (86) (87).

De estos datos se ve claramente que la pro-
ducción de Aldo a partir de B es mucho mayor que
a partir de 18-OH-B lo cual estaría en contradic-
ción con el esquema antes propuesto (Figura 2).

Sin embargo los resultados anteriores po-
drían explicarse con los siguientes argumentos:

1) La oxidación de B a Aldo es efectuada
por una única enzima cuyo sitio activo sólo re-
conoce a B. Luego, al incubar la enzima con

18-OH-B, ésta no es reconocida por aquélla, bajando el rendimiento de Aldo (11) (85).

2) La masa endógena de 18-OH-B es mucho mayor que la correspondiente a B. De esta forma los precursores radiactivos que se usan se "diluyen" más para 18-OH-B que para B resultando una producción menor de Aldo radiactiva a partir del primer precursor con respecto al segundo.

3) El precursor 18-OH-B se agrega al medio de incubación como forma M la cual es muy polar. Esa alta polaridad de la molécula le impediría atravesar las membranas para llegar al lugar de acción enzimática. Este problema no existiría si 18-OH-B se produjese "in situ" a partir de B (81).

4) La forma "M" de 18-OH-B, usada como precursor y aislada de tejido, posee un puente hemiacetalico 18,20 mientras que los tautómeros de Aldo poseen el puente en el sentido opuesto 11,18. De esta manera, la forma precursora para Aldo sería, o bien la forma abierta de 18-OH-B, o bien alguna forma menos polar que necesita condiciones especiales para su formación.

Esta lista de argumentos posibles para explicar la baja capacidad precursora de 18-OH-B para Aldo con respecto a B, no es de ninguna forma limitativa, pero sí constituye las hipótesis que más se han discutido en la literatura.

El argumento 1 deja de ser válido a la luz de los experimentos de "captura" por 18-OH-B radioinerte de la radiactividad proveniente de B, con la consecuente disminución de la de Aldo (80) (81).

El argumento 2 resulta asimismo objetable ya que usando mitocondrias, en las que los esteroides endógenos pueden considerarse despreciables, se siguieron obteniendo los mismos resultados. Asimismo, según datos personales no publicados, las cantidades de B y de 18-OH-B endógenas resultan similares o, de haber alguna diferencia, ésta no alcanza para justificar la variación observada en los rendimientos de Aldo.

Los argumentos 3 y 4 no pueden descartarse fácilmente. Más aún, acerca del argumento 4 existen datos que indican que algunas formas menos polares de la 18-OH-B producen mayor cantidad de Aldo (5) (7). A este respecto son relevantes también las ideas de Aupetit y col. (88) quienes proponen como precursora de Aldo una forma transformada de 18-OH-B, aunque no necesariamente menos polar. Estos autores obtienen una mayor cantidad precursora para Aldo cuando incuban 18-OH-B aislada de tejido adrenal previamente incubado con B tritiada, que cuando incuban la 18-OH-B sintética.

Estos argumentos forman parte de las hipó-

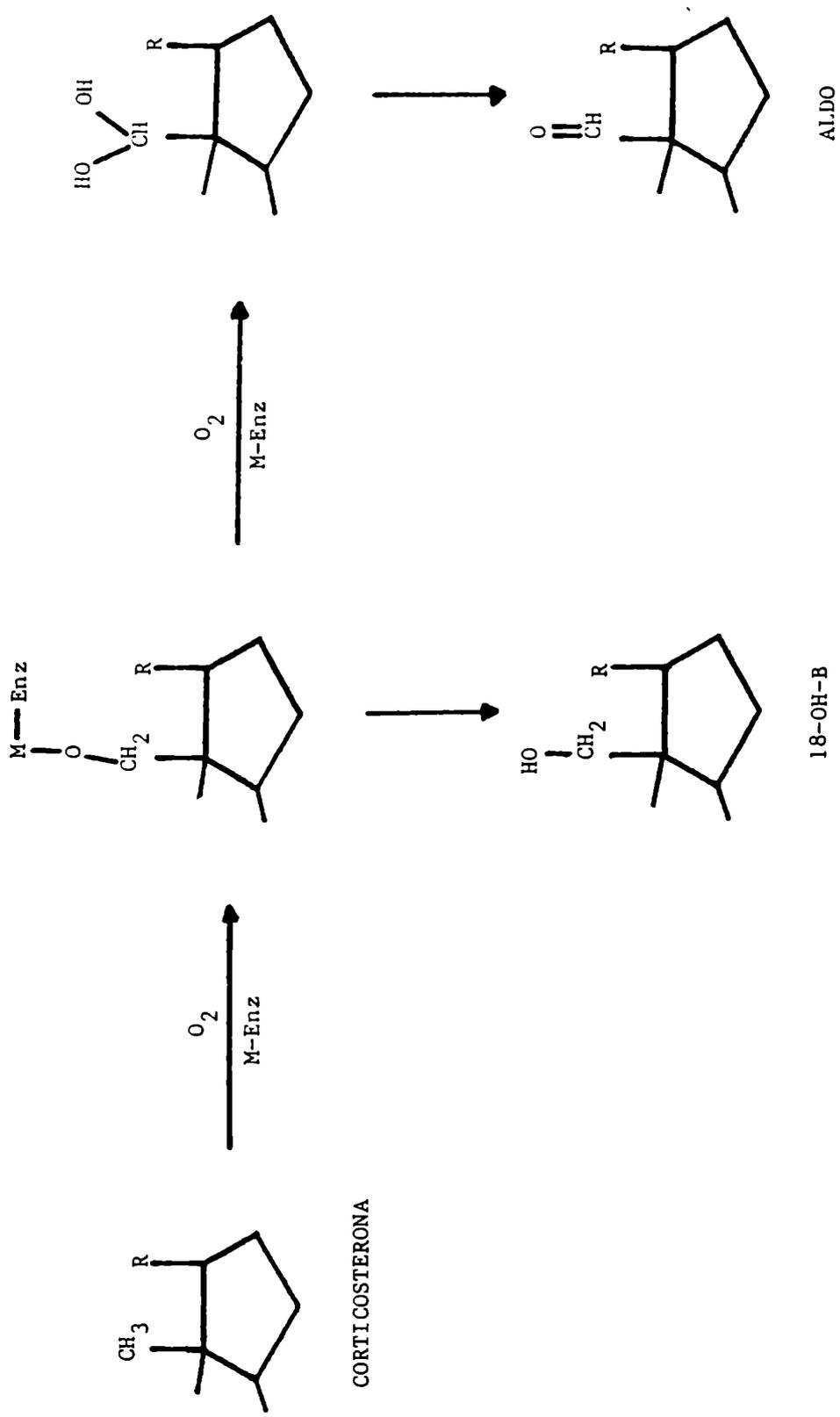


Figura 15: Esquema propuesto por Ulick (89) para la biosíntesis de Aldo a partir de Corticosterona. M-ENZ: metaloenzima.
R: COCH₂OH.

tesis planteadas para el desarrollo del presente trabajo de tesis: El argumento 3 se probó incluyendo a los precursores radiactivos en liposomas de lípidos no polares de adrenal de rata, mientras que el 4 se probó incubando diferentes formas menos polares de la 18-OH-B.

Con estos argumentos analizados, cabe ahora señalar que las hipótesis más generalmente aceptadas sobre la biosíntesis de Aldo a partir de 18-OH-B, admiten la existencia de un intermedio activo que difiere estructuralmente de la 18-OH-B aislada (forma "M"). El esquema más aceptado es el de Ulick (89) (Figura 15) quien postula como intermediario un complejo del esteroide con una metaloenzima, siendo la forma M de 18-OH-B bioquímicamente inerte y originada a partir del complejo. La hipótesis de Ulick explica satisfactoriamente algunas situaciones metabólicas y clínicas y está de acuerdo con las ideas generalmente propuestas para conversiones similares (90). Sin embargo el intermediario esteroide-metaloenzima no ha podido ser caracterizado.

Otra hipótesis similar propone una cadena de proteínas a la cual el intermediario biosintético activo estaría unido (91).

c) Mecanismos y co-factores.

En cuanto a los mecanismos involucrados en las oxidaciones de B y de 18-OH-B, desde los primeros trabajos se verificó y se aceptó que, en distintas especies, el pasaje de B a 18-OH-B consistía en una hidroxilación (60) (86) (92). Estas comprobaciones se realizaron estudiando los requerimientos de NADPH por NADP y de O₂. La oxidasa de función mixta responsable de esta hidroxilación fue denominada por Ulick (85) metil oxidasa.

La existencia de un mecanismo de hidroxilación para la oxidación de B a 18-OH-B, resulta si se quiere "lógico" observando las estructuras de ambos esteroides (Figura 2), si bien al aislar 18-OH-B se obtenga su forma M más que su forma abierta (Figura 9).

El mecanismo de la oxidación de 18-OH-B a Aldo, por el contrario, fue por largo tiempo discutida. Esto fue así desde ambos puntos de vista, el teórico y el experimental. En el primero es posible postular deshidrogenaciones o hidroxilaciones tal cual fue postulado por Fraser y Lantos (11) (Figura 16) y por Kojima (82), teniendo en cuenta las formas abiertas y/o cíclicas de la 18-OH-B y de la Aldo.

Desde el punto de vista experimental existen en la literatura datos que favorecen la deshi-

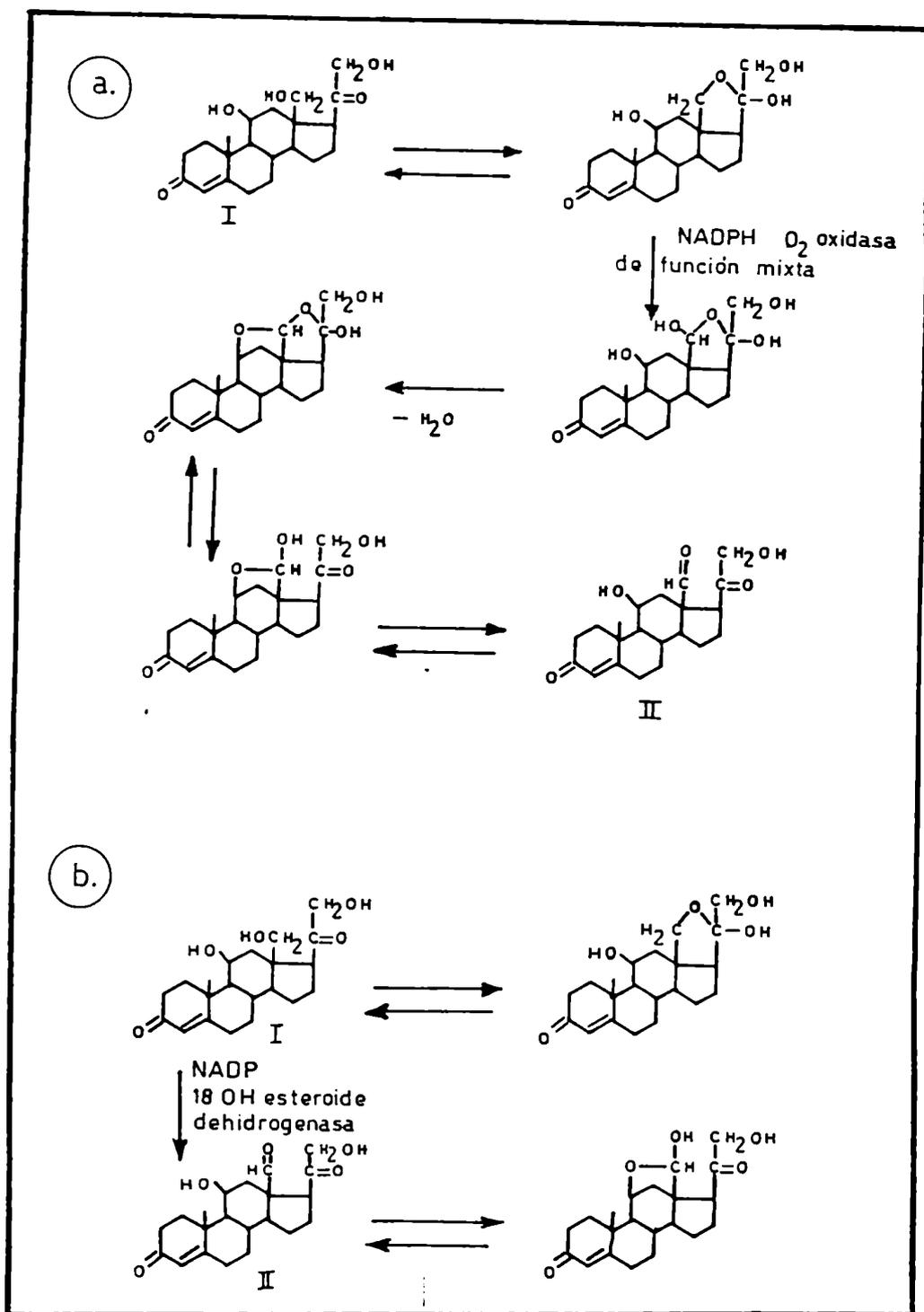


Figura 16: Caminos biosintéticos propuestos por Fraser y Lantos (11) para la obtención de Aldo según: a) una hidroxilación; b) una deshidrogenación.

drogenación (21) y otros que avalan una hidroxilación (87), si bien desde los estudios de Marusic y col. (93) tomó mayor forma la idea de una hidroxilación. Más recientemente se ha confirmado este mecanismo por los estudios de Aupetit y col. (94) (95) sobre requerimientos de co-factores, ATP e intermediarios del Ciclo de Krebs y por los de inhibición de la cadena transportadora de electrones del citocromo P-450 de Kojima y col. (81) (82).

Cabe destacar que las hidroxilaciones propuestas se efectuarían sobre la forma abierta (82) o sobre la forma M (95). Sobre la primera la dificultad reside en que se halla en muy baja proporción, mientras que sobre la segunda (forma M) el problema biosintético se presenta en que su ciclo (18 — O — 20) es opuesto al necesario para Aldo (11 — O — 18) (Figuras 9 y 12).

d) Compartimentalización a nivel celular.

Al incubar B radiactiva con las diferentes fracciones subcelulares obtenidas a partir de tejido adrenal se ha visto que la formación de 18-OH-B y de Aldo ocurre en mitocondrias (96) (60). Por otro lado se obtiene el mismo resultado cuando se incuba 18-OH-B radiactiva para obtener Aldo (97) (81) (94).

VII) LAS ZONAS DE LA CORTEZA SUPRARRENAL, SUS SECRECIONES Y FUNCIONES.

El par de glándulas suprarrenales de la rata adulta pesa alrededor de 35 mg.

En las glándulas seccionadas en mitades se pueden observar a simple vista las dos regiones aproximadamente equivalentes: la médula más clara y la corteza (Figura 17).

Es bien sabido que la región medular es de origen nervioso, que segrega catecolaminas y que, salvo situaciones patológicas, sólo la corteza segrega esteroides.

Los primeros estudios sobre zonización de los corticoesteroides fueron efectuadas por Giraud y col. (98) quienes encuentran, tal como era de esperar, que las zonas más contiguas a la médula, la fasciculada y la reticular (Figura 17), sintetizan B pero no Aldo, mientras que la zona glomerulosa produce Aldosterona. Más adelante Stachenko y Giraud demuestran que B es producida por ambas zonas (99). Lucis y col (100) y Ward y Birmingham (101), confirmaron estos resultados. Finalmente Sheppard y col. (102) demuestran que ambas regiones (glomerulosa y fasciculada-reticular) contienen las enzimas capaces de hidroxilar las posiciones 21, 11 y 18 de los pregnano esteroides.

Sin embargo luego se evidenció que las hidroxii-

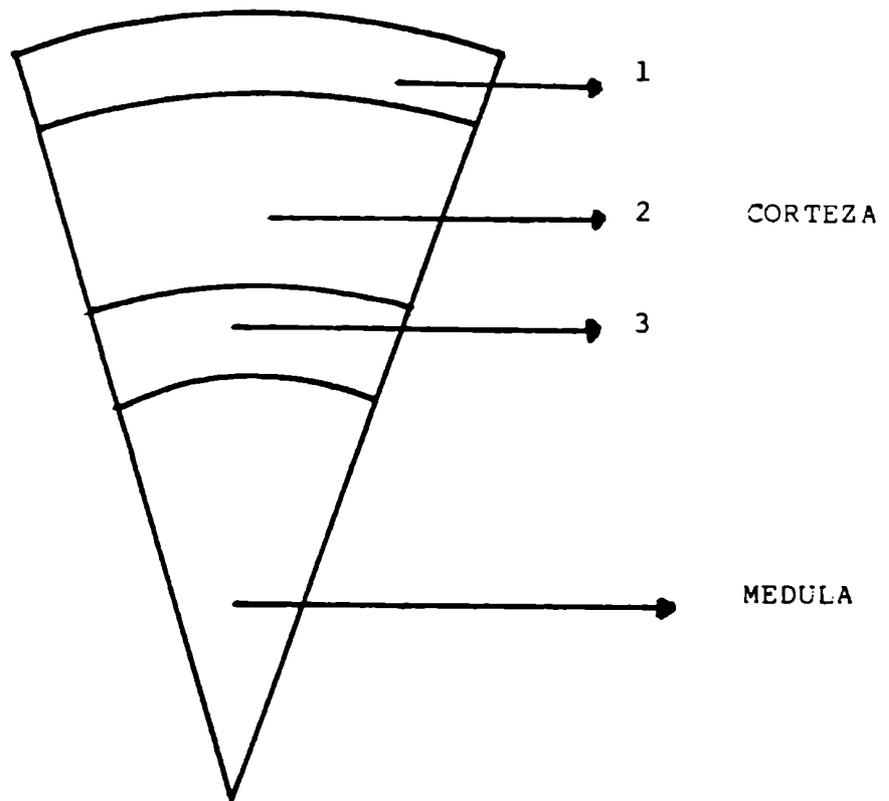


Figura 17: Zonas de la glándula adrenal.

1= Zona glomerulosa.

2= Zona fasciculada.

3= Zona reticular.

laciones en las posiciones 11 y 18 dependerían, para su zonización, del sustrato. En efecto, la 18-hidroxiación de B para dar 18-OH-B ocurre en ambas regiones indistintamente mientras que las de B y 18-OH-B hacia Aldo sólo ocurren en la glomerulosa (98) (92) (11) (102) (84).

Es así como surge la evidencia de que algunos esteroides pueden ser formados en ambas regiones (glomerulosa y fasciculada-reticular) pero sólo actúan como precursores en una de ellas. Para el caso recién mencionado de 18-OH-B Neher (84) y Ulick (89) propusieron que este esteroide sea intermediario de biosíntesis en una región (glomerulosa) y producto final en la otra. De Nicola y Dahl (103) postulan un mecanismo similar para DOC. En efecto, estos autores encuentran que DOC actúa como precursor en la zona glomerulosa, y como producto final en la zona fasciculada-reticular, sugiriendo así que la secreción de este esteroide se efectuaría a partir de esta última región.

Para la 11 β -hidroxilación de 18-OH-DOC como vía alternativa en la biosíntesis de Aldo (Figura 13) Müller demuestra que ocurre en la zona glomerulosa, si bien 18-OH-DOC también existe en la fasciculada-reticular (83).

En síntesis puede decirse, que "la razón de ser" de la glomerulosa sería, la de suministrar el

mineralocorticoide más potente mientras que la formación en ella de progesterona y corticosterona en pequeñas cantidades cumpliría un rol precursor. El rol de las zonas fasciculada y reticular, en cambio, es producir grandes cantidades de B utilizada por el organismo como hormona. Este esquema se mantiene válido en la actualidad.

VIII) IMPORTANCIA DE LAS REACCIONES ESPONTANEAS EN LA BIOSINTESIS DE ESTEROIDES.

La existencia de reacciones espontáneas, es decir no enzimáticas, en algunos caminos esteroideogénicos ha sido postulada como un mecanismo natural.

En efecto, Aragonés y col. (7), encontraron producción significativa de Aldo a partir de B y de una forma menos polar de 18-OH-B, "incubando" estos dos últimos esteroides en medio buffer sin tejido o con tejido adrenal previamente hervido.

Por otro lado, en el mecanismo de aromatización del anillo A de los andrógenos hacia estrógenos Fishman y Raju (104) y Hahn y Fishman (105) proponen tres hidroxilaciones enzimáticas consecutivas en las posiciones 19, 19 y 2 de Δ -4-androsteronediona; seguidas de un mecanismo no enzimático que finalizaría en la producción de estrona. De esta forma la función de la aromatasa sería la de producir estas tres hidroxilaciones (las cuales también han sido probadas por otros autores (106)), no interviniendo la enzima en el paso final de aromatización (deslocalización de electrones en el anillo A). De esta forma, los mismos autores explican que la enzima no sea inhibida por estrógenos ya que éstos no serían sus productos metabólicos. Sobre el mismo camino biosintético, otros autores (107) difieren en la po-

sición de la última hidroxilación, pero también admiten un mecanismo espontáneo para el reordenamiento final que concluya en la aromatización del anillo A.

IX) EFECTOS DEL ACTH SOBRE LA ALDOSTERONOGENESIS.

Son bien conocidos los efectos tróficos y glucocorticoidogénicos de la ACTH sobre los diversos sistemas enzimáticos de la corteza suprarrenal y el papel que cabe tanto al AMP cíclico como a proteínas inducidas de recambio rápido como intermedios de cada uno de estos efectos. Véase por ejemplo Garren y col. (108) y además (109) (110) (111).

En cambio, el efecto de la trofina sobre la biosíntesis de la Aldo a partir de B y el también postulado de la Aldo a partir de 18-OH-DOC es objeto de publicaciones aparentemente contradictorias de las cuales no resulta fácil sacar conclusiones válidas.

Algunos trabajos encuentran estimulación de Aldo a partir de B (112) (113) (114) (115) (116), otras inhibiciones (117) (118) (119) (120) (121) (79); siendo una de las pocas conclusiones claras las que se refieren a la respuesta bifásica obtenida en el humano por tratamiento prolongado con ACTH: primero la trofina estimula y luego inhibe esta secreción. (Ver por ejemplo (122)).

Quizás debamos buscar en esta observación clínica la clave de algunas contradicciones aparentes.

Una de sus causas podría ser los momentos medidos por los distintos autores: estimulación encuentran aquellos que miden respuestas rápidas e inhibición los que miden respuestas en la fase crónica. La otra diferencia

de los modelos experimentales se refiere a las concentraciones empleadas: inhibición con altas dosis, estimulación con bajas dosis.

El modelo utilizado: una revisión crítica de la literatura demuestra que aparentemente las preparaciones más complejas exhiben inhibición mientras que los sistemas purificados de glomerulosa exhiben, al menos en sus fases más agudas, estimulación.

Y finalmente tiene importancia la especie elegida ya que la rata parece ser más sensible al efecto inhibitorio que otras especies mamíferas.

Una "review" reciente de este grupo (22) trata de sistematizar las revisiones críticas de todos estos trabajos y postula que el efecto inhibitorio y estimulador coexisten pero que el predominio de uno u otro se hallan determinados por factores tales como concentración de tro fina, complejidad del sistema y duración del tratamiento, siendo las especies no 17 hidroxilantes más sensibles al efecto inhibitor que las 17 hidroxilantes.

Hasta qué punto estos efectos opuestos se hallan bajo el control alternativo de fosforilaciones y defosforilaciones de estos sistemas enzimáticos (123) no está aún aclarado y no forma parte de la temática de esta tesis.

Otros trabajos muy recientes (124) parecen haber demostrado que un cierto número de genes adrenocorticales son regulados negativamente por ACTH.

A este cuadro confuso se suma el interrogante del efecto trofínico sobre los dos pasos de la 18-metiloxidación. Hay algunas evidencias que indicarían que tanto "in vivo" como "in vitro" la ACTH sólo estimula (125) (126), pero no inhibe, la formación de 18-OH-B a partir de B; o sea la primera metil-oxidasa, lo cual significaría que el efecto inhibitorio ocurre de algún modo entre 18-OH-B y Aldo.

Esta última propuesta será discutida más a fondo a la luz de los resultados de la presente tesis.

O B J E T I V O S

O B J E T I V O S

Lo que antecede constituye una puesta al día del problema de los pasos B a Aldo hasta la presente tesis.

Resumiendo: en una primera etapa se pudo comprobar que el intermediario 18-OH-B formaba, como consecuencia de su estacionamiento en ciertos solventes orgánicos, lo que se creía que era una forma única de baja polaridad y que esta forma aparentemente artefactual era un precursor relativamente eficaz de la Aldo (2) (5). En una segunda e etapa se pudo comprobar que formas y derivados no polares de la 18-OH-B podían obtenerse de varias maneras: solventes orgánicos neutros, solventes orgánicos acidificados, medio acuoso ácido y que las formas y derivados menos po lares resultantes eran múltiples. Se intentó en esta etapa caracterizar a estas formas y seleccionar entre ellas buenas precursoras (3) (6). Lo primero se consiguió a medias postulándose con los métodos disponibles en esa época varias estructuras alternativas posibles para algunos derivados (6). Una cierta precursoridad sólo se pudo establecer para una de estas formas que sólo exhibía una transformación espontánea (sin requerimiento de fuente enzimática) a Aldo (7).

Los objetivos de esta tesis nacieron de las dudas que planteaban estos resultados aislados:

PRIMERO: estudiar los metabolitos que se producen al incubar, bajo condiciones clásicas, 18-OH-B tritia

da con suprarrenales.

SEGUNDO: haciendo todas las combinaciones posibles con condiciones que abarcaban: 3 niveles de pH (uno neutro y dos ácidos), la presencia o la ausencia de enzimas, la naturaleza del precursor (forma de obtención) y la inclusión o no de éste en liposomas de grasa de tejido adrenal; cuántas y cuáles de estas condiciones resultarían favorables para una conversión de 18-OH-B a Aldo.

Como se apreciará la combinación de estas condiciones constituyen una sistematización de aquellas utilizadas en experimentos anteriores que de alguna manera han demostrado contribuir a la precursoriedad de la 18-OH-B. La elección de los niveles de pH no fue fortuita sino consecuencia de la que entre tanto se aprendió en la literatura sobre pHs de organelas subcelulares. La elección de liposomas adrenales reemplazando a los solventes orgánicos utilizados en experimentos anteriores fue consecuencia de la creciente importancia que adquieren estas preparaciones como simuladores de fenómenos biológicos en interfases.

TERCERO: en las condiciones que demostraron ser favorables, cuáles eran las características físico-químicas del o de los compuestos formados.

CUARTO: la estructura definitiva de estos compuestos.

QUINTO: la precursoriedad de estas formas definitivamente identificadas, utilizando, en el caso de 18-DAL, el compuesto sintético como sustrato.

SEXTO: si los mismos se encontraban como eslabones intermedios entre B y Aldo y/o entre 18-OH-B (M) y Aldo. Esto constituía la base para la postulación de un camino metabólico entre B y Aldo con pasos enzimáticos y espontáneos.

SEPTIMO: distribución subcelular "fina" (separando y considerando separadamente Matriz mitocondrial, Membrana externa y Espacio intermembrana como organelas) de las enzimas.

OCTAVO: principio del estudio de la regulación de los pasos involucrados en sexto.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I) FORMAS MENOS POLARES DE LA 18-OH-B EN MEDIO HCl.

a) Su formación y análisis por cromatografía en papel (C.P.).

Para obtener las formas menos polares de que se hace referencia en la Introducción para luego ser ensayadas como precursores se siguió el método utilizado por Aragonés y col. (6).

1 μ Ci de 1,2-³H-18-OH-B (52 Ci/mmol) en residuo seco se suspendió en 0,2 ml de HCl 10⁻² N. Luego de 10 minutos la suspensión se sembró sobre papel Whatman N^o 1 y se desarrolló cromatográficamente en el sistema Bush B₅ (Benceno + Metanol + Agua = 2 : 1 : 1). Finalizada la cromatografía se detectaron las zonas radiactivas por medio de radiocromatografía (Radiocromatógrafo Packard, Modelo 7201). Se eluyó el material radiactivo correspondiente a cada pico (3 veces con 4 ml de metanol cada vez). Sobre alícuotas de los extractos metanólicos obtenidos de la elución se midió la radiactividad por medio de centelleo líquido (Sección IV de Materiales y Métodos). Para la asignación de los R_M el cromatograma fue comparado con otro de 18-OH-B que se corrió paralelamente. Los picos obtenidos fueron 5, a saber: R_M = 1; 4.33; 5.26; 6.33 y 7.18; es decir

se obtuvieron 4 formas menos polares de 18-OH-B, de acuerdo con Aragonés y colab. (6).

b) Su formación y análisis por cromatografía líquida de alta presión.

Se caracterizaron también por cromatografía líquida de alta presión (CLAP) las formas menos polares de la 18-OH-B. La preparación de la muestra para analizar por CLAP fue realizada de la siguiente manera: se suspendieron 140 µg de 18-OH-B radioinerte en HCl como se indicó anteriormente y a la suspensión se le efectuaron 3 extracciones con Cl_2CH_2 . El extracto orgánico total se dividió en 2 partes: A y B. El extracto A se llevó a sequedad (37°C; N_2) y se analizó inmediatamente por CLAP. El extracto B se llevó a 1 ml (37°C; N_2) y se agregó 1,5 ml del solvente a usar en CLAP. Se continuó luego la evaporación hasta la eliminación total del Cl_2CH_2 y la solución se analizó inmediatamente por CLAP. En la Sección III de Materiales y Métodos se detallan las condiciones de uso para CLAP.

El análisis de las muestras A y B tuvo por objetivo investigar si el pasaje de la mezcla de formas menos polares de la 18-OH-B por residuo seco (muestra A) alteraba los resultados posteriores de Análisis Cuantitativo. Este objetivo se entenderá mejor a la luz de los estudios de reversibilidad

(Ver más abajo punto d)) que indicaban que, en sequedad, algunas formas menos polares podían revertir a la forma más polar de 18-OH-B (forma M, de $R_M = 1$).

En ambos casos (muestras A y B) se obtuvieron 5 picos con los siguientes tiempos de retención (T_R): 3,15; 3,40; 3,70; 4,85 y 6,05 min. (con Acetonitrilo: H_2O (85 : 15) como fase móvil); y 4,15; 4,60; 4,80; 7,20 y 9,55 min. (con Metanol: H_2O (70 : 30) como fase móvil) siempre con un flujo de 1 ml/min. Bajo las mismas condiciones 18-DAL dió, como T_R , 3,40 min y 4,60 min respectivamente. Cada pico fue cuantificado contra una curva de calibración efectuada con Corticosterona.

c) Correlación entre CP y CLAP.

Por último se procedió a correlacionar los picos obtenidos por CP y CLAP. Con este fin se suspendieron 100 μg de $1,2-^3H-18-OH-B$ ($A_e = 0,04 \mu Ci/Ug$) en $HCl 10^{-2} N$. La suspensión se trató de la forma antes indicada para la Muestra A de la CLAP, y el material correspondiente a cada pico se colectó según las condiciones que nos aseguran el 100% de recolección según los estudios llevados a cabo al respecto (Ver Materiales y Métodos Sección III) (127). Cada muestra recolectada se llevó a un pequeño volumen ($\sim 0,3 ml$) a temperatura ambiente, en dese-

cador bajo vacío , se sembró sobre papel Whatman Nº 1 y se desarrolló en el sistema Bush B₅ (73). Las zonas radiactivas se revelaron por radiocromatografía, obteniéndose en cada caso un sólo pico al cual se midió el Rf.

Conociendo los T_R y los Rf de cada pico, se efectuó la correlación buscada.

d) Estudios de reversibilidad de las formas menos polares de la 18-OH-B.

Se estudió la reversibilidad de las distintas formas menos polares de la 18-OH-B bajo distintas condiciones, a saber:

- a) en residuo seco, bajo N₂, durante 24 hs.
- b) en residuo seco, bajo N₂, durante 7 días.
- c) en NH₃ 1,3 x 10⁻² N, bajo N₂, durante 24 hs.
- d) en NH₃ 1,3 x 10⁻² N, bajo N₂, durante 7 días.

Con tal fin se prepararon, cromatografiaron, detectaron y eluyeron con metanol las 4 formas menos polares de la 18-OH-B como se indicó anteriormente. Luego se separaron cada uno de los extractos metanólicos correspondientes a cada una de las formas menos polares en 5 partes equivalentes al 8% del total la primera (muestras L₈) y al 23% cada una de las 4 restantes (muestras L₂₃). De esta manera se obtuvieron 5 fracciones. Estas fracciones fueron llevadas a sequedad (37°C; N₂). De los residuos

secos obtenidos, 2 fracciones L_{23} de cada una de las formas menos polares se dejaron a 27°C en oscuridad, bajo N_2 , durante 1 día una de ellas (S_1) y durante una semana la otra (S_2). A los otros dos residuos secos provenientes de las otras 2 fracciones L_{23} se les agregó 0,5 ml de solución acuosa de NH_3 0,013 N y se dejaron a 27°C , en oscuridad, bajo N_2 , agitándolas ocasionalmente, durante 1 día (AS_1) o una semana (AS_2). Terminados los períodos de tiempo indicados en cada caso, las fracciones S_1 y S_2 se tomaron con Cl_2CH_2 y se sembraron sobre papel Whatman Nº 1 para ser corridas luego en el sistema Bush B5 (73). Por otro lado las fracciones AS_1 y AS_2 se neutralizaron con ClH y se llevaron a sequedad bajo N_2 , a 37°C y presión reducida. Los residuos secos así obtenidos se tomaron con Cl_2CH_2 y se sembraron sobre papel Whatman Nº 1 para ser desarrollados también en el sistema Bush B5. Paralelamente a las cromatografías de todas las muestras, se cromatografió 18-OH-B-1,2- ^3H ; una suspensión de ella en HCl 10^{-2} N y las muestras L_8 , con el fin de poder comparar y asignar las zonas radiactivas de los cromatogramas provenientes de las muestras pertenecientes al estudio de reversibilidad.

Los cromatogramas fueron radiocromatografiados. Luego de medir el R_f el material de cada zona radiactiva se eluyó con metanol y se midió la

radiactividad por centelleo líquido

e) Estudios estructurales.

e.1) Espectros de Resonancia Magnética Nuclear:

El principal producto que se obtiene por suspensión de 18-OH-B en HCl 10^{-2} N, es el de R_M 4.33 en C.P. En mis manos este producto se formó en un 80%, siendo el obtenido por Aragonés (6) de un 60%. Se encaró, entonces, el estudio de la estructura de tal compuesto por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno (1H) y de Carbono-13 (^{13}C): 1,1 mg de 18-OH-B-radioinerte (M) se disolvieron en Cl_3CD y se efectuaron los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C . Luego se burbujearon vapores de Cloruro de hidrógeno en la solución, y nuevamente se efectuaron los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C .

Como ya se había sugerido (6) que la forma menos polar R_M 4.33 podía consistir, al menos en parte, en 18-Desoxialdosterona, se efectuaron también los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C de éste último esteroide, el cual fue obtenido por hidrólisis ácida de 18-Desoxialdosterona-21-Acetato (Ver más adelante). Con tal fin 13 mg de 18-Desoxialdosterona se disolvieron en Cl_3CD y luego se efectuaron los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C , los cuales luego fue-

ron comparados con los espectros anteriores.

e.2) Comparaciones Cromatográficas: El material radioinerte de los espectros de RMN, obtenido en cada caso por evaporación hasta sequedad, se cromatografió sobre papel , en el sistema Bush B5, y por CLAP en las condiciones usadas para la separación de las distintas formas menos polares de la 18-OH-B.

En ambos casos el material correspondiente al R_f o al T_R , respectivamente, del producto principal se eluyó (CP) o se colectó (CLAP). Cada fracción así obtenida se mezcló con una suspensión de $1,2\text{-}^3\text{H-18-OH-B}$ en HCl y se cromatografió en papel, en el sistema Bush B5, y por CLAP según las condiciones anteriores. Se reveló la CP y la zona de mayor radiactividad coincidió con la de mayor absorción al UV. En la CLAP se colectó, según las condiciones óptimas (127), el material correspondiente al pico de mayor Absorbancia a 254 nm, y luego de llevar a sequedad por evaporación del solvente, se midió la radiactividad. Con estas últimas cromatografías de los materiales a los que se les efectuaron los espectros de RMN, se pudo establecer que por agregado a 18-OH-B de vapores de Cloruro de hidrógeno se formó sobre todo un

compuesto con propiedades cromatográficas iguales al denominado R_M 4.33 y cuyos espectros eran iguales a los de 18-Desoxialdosterona.

e.3) Por último, con el fin de ver si el derivado menos polar de la 18-OH-B R_M 4.33 se formaba gracias al medio ácido debido al HCl o si, en cambio, las causas eran concentraciones iónicas o aumento de la polaridad del medio; o sea, en otras palabras, para ver si en la reacción de pasaje de M a R_M 4.33 intervenía químicamente el H^+ y en dónde, se repitió la formación de R_M 4.33 a partir de M radioinerte disuelta en Cl_3CD , por agregado de DCl, y se efectuaron inmediatamente los espectros de RMN. Como es bien sabido el D^+ tiene constantes específicas de velocidad menores que el H^+ y así viendo, por los espectros de RMN, la velocidad de formación del derivado menos polar R_M 4.33, se podría obtener respuesta a la finalidad planteada.

Los espectros de RMN de 1H se realizaron a 300 MHz en un Bruker WB-300. Los espectros de RMN de ^{13}C se realizaron a 75 MHz en un Bruker WB-300 o a 25.2 MHz en un Varian XL-100-15 operando en el modo de la Transformada de Fourier (FT-modo) con desacoplamiento de 1H .

e.4) Obtención de 18-Desoxialdosterona radioinerte
a partir de 18-Desoxialdosterona-21-Acetato:

18 mg de 18-Desoxialdosterona-21-Acetato se di
solvieron en 0,26 ml de cloruro de metileno y
0,83 ml de metanol. A esta solución se le agreg
aron 0,18 ml de HCl 8 N (0,12 ml de HCl concentr
ado más 0,06 ml de agua).

La mezcla final se agitó vigorosamente
durante 44 horas y luego se diluyó con cloruro
de metileno. La capa orgánica se separó; se lavó
con NaHCO_3 (solución acuosa saturada) y agua;
y finalmente se secó con SO_4Mg . El extracto
orgánico se evaporó a sequedad, obteniéndose
18-Desoxialdosterona cromatográficamente pura
(TLC y HPTLC).

II) FORMA MENOS POLAR DE LA ALDOSTERONA EN MEDIO HCl.

a) Su formación.

0,04 μ Ci de Aldosterona-4- 14 C (Ae=52 mCi/mmol) en residuo seco se suspendieron en HCl 10^{-2} N (0.1 ml) durante 5 minutos. Luego la suspensión se sembró sobre papel Whatman N^o 1 y se cromatografió en el sistema Bush B₅ (73). El cromatograma se reveló por radiocromatografía y se obtuvieron dos picos: uno correspondiente a Aldosterona (Rf = 0,31) y otro de Rf = 0,92, que se denominó forma menos polar de la Aldosterona (FMPA). Este último compuesto se eluyó con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez), y el extracto metanólico se llevó a sequedad bajo N₂ a 37°C. El residuo seco se sembró sobre papel Whatman N^o 1 y se cromatografió en el sistema Bush A. El revelado por radiocromatografía evidenció 1 pico de Rf = 0,13. El material radiactivo se eluyó con Metanol, se llevó a residuo seco a 37°C bajo N₂ y se sembró sobre papel Whatman N^o 1 para ser corrido en el sistema CyDiI (128). El cromatograma obtenido se reveló por radiocromatografía, evidenciándose así un sólo pico de Rf = 0,78. Se eluyó el material radiactivo correspondiente a esta última zona y el extracto metanólico obtenido se trató durante 20 hs a 28°C con 0.1 ml de Piridina y 0,1 ml de Anhídrido Acético. Transcurrido el tiempo indicado se agregó 1 ml de

Metanol, se agitó, y luego de 10 minutos se llevó a sequedad a 37°C bajo N₂. El residuo seco se sembró sobre papel Whatman Nº 1 y se desarrolló cromatográficamente en el sistema CyDi I. El revelado por radiocromatografía evidenció 1 sólo pico a Rf= 0,96.

b) Estudios de reversibilidad de la forma menos polar de la Aldosterona.

Se estudió reversibilidad de la FMPA obtenida en medio ácido clorhídrico, bajo las siguientes condiciones:

- 1) en residuo seco, bajo N₂, durante 24 hs.
- 2) en residuo seco, bajo N₂, durante 7 días.
- 3) en NH₃ 1,3 x 10⁻² N, bajo N₂ durante 24 hs.
- 4) en NH₃ 1,3 x 10⁻² N, bajo N₂ durante 7 días.

Con tal fin se preparó la forma menos polar de Aldosterona a partir de Aldosterona-¹⁴C y HCl, se separó cromatográficamente de Aldosterona, y se eluyó con Metanol, de la forma indicada en la sección anterior. El extracto metanólico obtenido se dividió en 4 alícuotas de volúmenes iguales y cada una se llevó a sequedad. Dos de ellas fueron guardadas en atmósfera de N₂, durante 24 hs y 7 días respectivamente, a 28°C, en oscuridad. A las dos restantes se agregó 0,5 ml de NH₃ 1,3 x 10⁻² N y se dejaron a 28°C, en oscuridad bajo N₂, agitando ocasionalmente, durante 24 hs y 7 días respectivamente.

Transcurridos los tiempos indicados en cada caso las fracciones en residuo seco se sembraron sobre papel Whatman Nº 1 y se desarrollaron cromatográficamente en el sistema Bush B₅. Por otro lado las fracciones mantenidas en NH₃ se neutralizaron con HCl y se llevaron a sequedad bajo N₂, a 37°C. Los residuos secos obtenidos se sembraron y trataron como antes. Paralelamente a las cromatografías indicadas se corrió una mezcla de Aldosterona-¹⁴C + HCl 10⁻² N.

c) Estudios de formación de la forma menos polar de Aldosterona en HCl, con distintas cantidades de reactivo.

Con el objeto de poder estudiar la existencia de alguna relación entre las cantidades de reactivo y de producto en la reacción de formación, a partir de Aldosterona, de su forma menos polar, se disolvieron cantidades crecientes de Aldosterona-¹⁴C (Ae = 57 mCi/mmol), desde 5 hasta 30,8 nmoles, en 0.1 ml de HCl 10⁻² N. Luego de 5 minutos la suspensión se sembró sobre papel Whatman Nº 1 y se desarrolló cromatográficamente en el sistema Bush B₅. El cromatograma obtenido se reveló por radiocromatografía y el material radiactivo correspondiente a los dos picos obtenidos (Aldosterona remanente y su forma menos polar) se eluyó con Metanol (4 veces

con 3 ml de Metanol cada vez). De los extractos metanólicos se tomaron alícuotas en las que se midió la radiactividad por centelleo líquido. Luego se graficaron los valores de radiactividad debida a la Aldo remanente (X) con los de la forma menos polar de la Aldo (Y). Así se representó Y vs X e Y^2 vs X.

d) Estudios estructurales sobre la forma menos polar de la Aldosterona.

d₁) Resonancia Magnética Nuclear.

25 mg de Aldosterona radioinerte se disolvieron en 0,4 ml de hexadeuterometilsulfóxido. Luego se burbujearon vapores de HCl a través de la solución.

La muestra así preparada se analizó por RMN de ^{13}C y ^1H directamente. Los espectros mostraron la presencia de varias formas en equilibrio, con señales muy anchas.

Entonces se procedió a aislar de la solución de derivado menos polar de la Aldosterona de la siguiente manera: se diluyó la solución con agua, y se extrajo 4 veces con Cl_2CH_2 . El extracto orgánico se llevó a sequedad bajo N_2 , a 37°C ; y el residuo seco así obtenido se analizó por placa delgada sobre sílica gel usando benceno: acetato de etilo (2 : 1) y hexano: acetona (5 : 4) como fases móviles. Así se pudo establecer que se trataba de una mezcla de

dos compuestos, los cuales se separaron por CLAP. En la CLAP se usó una columna Alltech R-Sil C₁₈ HL 10 µm column (500 x 10 mm) con Metanol: H₂O (70 : 30) como eluyente, a un flujo de 4 ml/min. En el cromatograma obtenido por análisis continuo del eluido (Índice de refracción) se evidenciaron dos picos uno de los cuales (Volumen de Retención = 46 ml), el correspondiente a la FMPA, se colectó, se evaporó el solvente a 37°C a presión reducida, y el sólido seco obtenido se usó para análisis por RMN. Al igual que antes el material se disolvió en hexadeuterometilsulfóxido y la solución se analizó por RMN de ¹³C y ¹H.

Los espectros de RMN, en ambos casos, se midieron a 100 MHz para ¹H y 25.2 MHz para ¹³C, en un espectrómetro Varian XL-100-15 operando en el modo de la Transformada de Fourier (FT-M).

d₂) Espectrometría de Masas.

La FMPA se analizó también por EM.

Con este fin se preparó dicho compuesto a partir de Aldo + HCl y se separó por CLAP como se indicó antes en el estudio por RMN.

La FMPA así obtenida se sometió a análisis por EM de dos maneras: tal cual (o sea sin derivatizar) y derivatizada (trimetil sililada). Para ésto último, 3 mg de Aldosterona-radioinerte se

disolvieron en 0,05 ml de piridina y 0,2 ml de BSTFA (bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) dejándose la solución 3 hs a 25°C. Los productos se extrajeron con Cl_2CH_2 y el extracto orgánico se lavó una vez con H_2SO_4 1 M y 2 veces con H_2O . Luego se lo secó sobre Na_2SO_4 (77)(129).

Los espectros de masa se registraron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian Mat CH- 7 A; habiéndose colocado las muestras directamente.

III) CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.

La CLAP se utilizó de acuerdo a los siguientes modos y finalidades:

- a) CLAP Analítica: para determinar los T_R de las formas menos polares de la 18-OH-B y de la Aldo.
- b) CLAP Preparativa: para separar la Aldosterona de su forma menos polar, la cual luego se usó en estudios estructurales por RMN y EM.

a) CLAP Analítica.

1) Generalidades: para la CLAP Analítica se usó un equipo Waters Associates (Milford, Mass., U.S.A.) equipado con un sistema propulsor de solventes modelo 6000 A, un inyector modelo U6K, un detector continuo de absorbancia modelo 440 (detector de longitud de onda fija) para monitorear el efluente a 254 nm, y un registrador Omni Scribe modelo B-5117-1, de una sola pluma.

Las columnas de Acero Inoxidable de 300 mm de largo x 3,9 mm de diámetro interno contenían como relleno partículas de sílica unidas con octadecasilano (130;131) (U-Bondapak C-18) por lo cual las corridas cromatograficas resultaron de fase reversa (130;131).

Antes de las determinaciones, la columna se limpió con H_2O y metanol sucesivamente. Durante el

lavado con metanol, se inyectó 3 veces 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO).

La eficiencia de la columna fue chequeada por la constancia, durante las determinaciones, de los parámetros altura reducida de un plato teórico, velocidad reducida y resistencia de la columna (132 ; 133 y 134).

2) Solventes: Acetonitrilo fue de Carlo Erba, grado RPE. Metanol Carlo Erba, grado AR, se redestiló antes de su uso. Agua fue destilada dos veces sobre vidrio.

Todos los solventes se filtraron a través de filtros Millipore (Tipo HA de tamaño de poro 0,45 Um para agua; y Tipo FH de tamaño de poro 0,5 Um para los otros).

3) Elución Isocrática: Una fase móvil para la mayoría de los esteroides, consistente en Metanol-H₂O (70:30) (135) se usó en las pruebas de eficiencia de la columna, las determinaciones del R_c (Retardo de Colección, Ver más adelante), en las curvas de calibración para la cuantificación de esteroides y en sus determinaciones cuanti y cualitativas.

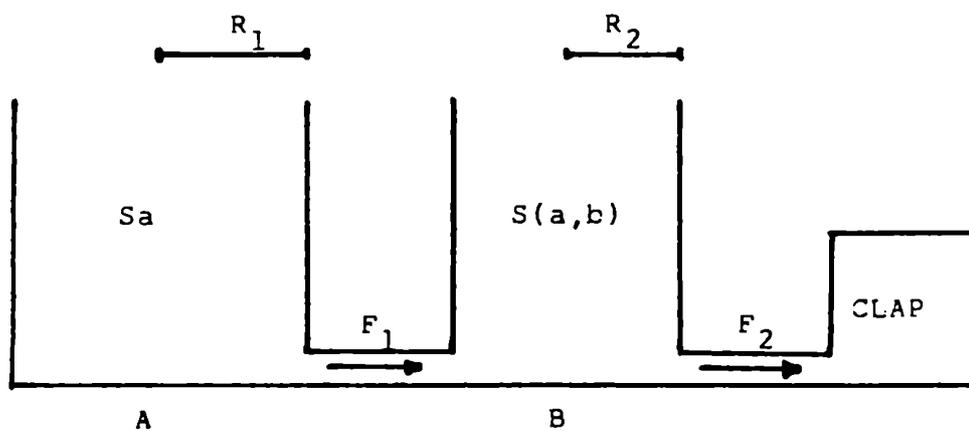
La fase móvil Acetonitrilo-H₂O (85:15) se usó también en las determinaciones cuanti y cualitativas.

Las muestras se disolvieron en las mismas fases móviles en las que iban a ser cromatografiadas.

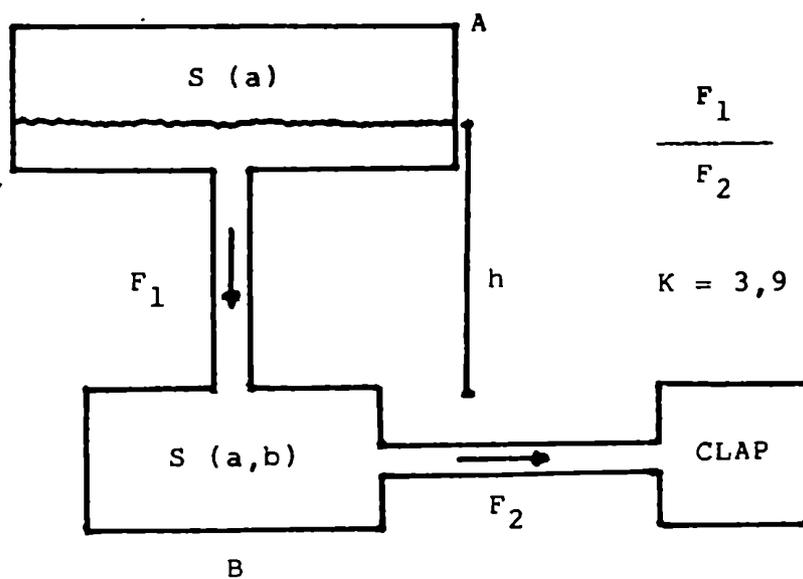
4) Elución por Gradiente: Las determinaciones analíticas también se efectuaron usando gradientes de elución de Metanol-Agua y de Acetonitrilo-Agua, disolviéndose la muestra en el solvente orgánico de cada fase. Como no se dispuso de equipos comerciales para la producción de gradientes de elución; éstos se realizaron de la siguiente manera (136).

4 A) Dispositivo Nº 1 para producir Gradiente de Elución: En la Figura Nº 18 se halla representado un dispositivo empleado, el cual es ampliamente usado en cromatografía en columna. Este consistió básicamente en 2 frascos comunicantes A y B de secciones convencionales adecuadas que contienen respectivamente los solventes Sa y Sb. Al bombear al cromatógrafo el solvente contenido en B con flujo F2, se produce una diferencia de nivel entre los vasos que origina un flujo F1 de Sa hacia B donde forma con Sb el solvente de elución S (a, b); produciendo un gradiente regulable de concentraciones.

4 B) Dispositivo Nº 2 para producir Gradiente de Elución: En la Figura Nº 18 se halla representado el segundo dispositivo usado, cuyo fundamento es obvio, consistente en 2 recipientes A y B, del primero de los cuales, colocado a altura h respecto a B, fluye Sa con flujo F1 hacia B. En éste forma con Sb la solución eluyente S (a, b) cuyo flujo F2 hacia el cromat-



$$\frac{F_2}{F_1} = 1 + \frac{R_2^2}{R_1^2}$$



$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{Kh}{F_2}$$

$$K = 3,9 \times 10^{-3} \frac{\text{ml}}{\text{cm} \times \text{min}}$$

Figura 18: Dispositivos empleados para producir gradientes de elución. Ver el texto.

tógrafo es determinado por su bomba de aspiración.

4 C) Modelo Matemático de los Dispositivos para Gradientes de Elución: El modelo matemático usado es una variante del desarrollado por Cherkin (137).

Si se tienen dos recipientes A y B con flujos F_1 desde A hacia B y F_2 desde B hacia el exterior del dispositivo, habiendo inicialmente solvente S_a en A y S_b en B (Figura 18) se puede escribir.

$$dV = \frac{-F_2 V dt}{V_0 + (F_1 - F_2) t}$$

donde V = volumen de S_b en B al tiempo t .

V_0 = volumen de S_b en B al tiempo $t = 0$.

1^{er} Caso: Resolviendo la ecuación diferencial para $F_1 \neq F_2$ queda:

$$V = V_0 \frac{1}{1-\theta} \left(\frac{\theta}{\theta-1} \right)^{\frac{1}{1-\theta}}$$

donde $\theta = \frac{F_2}{F_1}$

Denotando luego como P_B y P_B^0 a las proporciones de B en S (a,b) a los tiempos t y $t=0$ respectivamente, resulta:

$$P_B = P_B^0 \frac{1}{1-\theta} \left(\frac{1}{\theta-1} \right)^{\frac{1}{1-\theta}}$$

Esta expresión para $\theta = 2$ queda:

$$P_B = P_B^0 - \frac{F_2 P_B^0 t}{2 V_0}$$

o sea un gradiente lineal.

De la misma forma, para $\theta = \frac{3}{2}$ se obtendrá un gradiente cuadrático, y así sucesivamente.

2do. Caso: Resolviendo la ecuación diferencial anterior para $F_1 = F_2$ (o sea $\theta = 1$) queda:

$$v = v_0 e^{-\frac{F_2}{v_0} t}$$

y finalmente

$$P_B = P_B^0 e^{-\frac{F}{v_0} t}$$

o sea un gradiente exponencial.

Como conclusión puede decirse entonces que regulando el valor de θ se obtienen los distintos tipos de gradiente de elución.

Es muy importante señalar que todas las ecuaciones finales obtenidas son válidas solamente cuando F_2 es constante. Esta condición es estrictamente cumplida en el caso aplicado aquí ya que ese flujo es fijado por el cromatógrafo de CLAP.

4. D) Cómo se logra regular θ en los 2 dispositivos usados para la obtención de gradientes de elución:

Para el Dispositivo Nº 1 (Figura 18), se puede ver fácilmente que:

$$\theta = \frac{F_2}{F_1} = 1 + \left(\frac{R_B}{R_A} \right)^2$$

Entonces para regular θ , basta con regular el cociente R_B / R_A . En nuestro caso:

Para Gradiente Lineal.

$$\theta = 2 \qquad R_B = R_A$$

(recipientes iguales)

Para Gradiente Exponencial.

$$\theta = 1 \qquad R_B = 0 \qquad R_B \ll R_A$$

(Teórico)

(Práctica)

Para el dispositivo Nº 2 (Figura 18) se puede ver que:

$$F_1 = K h$$

donde K es una constante para una sección dada de salida de F_1 .

En nuestro caso K se determinó experimentalmente midiendo F_1 para distintos valores de h.

Luego:

$$\theta = \frac{F_2}{F_1} = \frac{F_2}{K h} = \frac{F_2}{K} \cdot \frac{1}{h}$$

Entonces, el valor de θ es fijado regulando h ya que F_2 es el flujo constante dado por el cromatógrafo.

4 E) Comprobación Experimental del Gradiente de Elución: Para ambos dispositivos de formación de gradiente de elución, éste se comprobó colocando metanol como Sb y una solución metanólica de rojo sudán como Sa. Al monitorear la Absorbancia del efluente a 405nm se obtuvo un cromatograma que resultó ser la gráfica de "concentración de rojo Sudán vs. tiempo" esto es el gráfico del gradiente de elución, el cual coincidió exactamente con la predicción del modelo matemático.

5) Flujos: Flujos de 0,2 ml/min se usaron para la colección de las distintas fracciones. El flujo de 1 ml/min se usó para las determinaciones analíticas.

El RC (Ver más adelante) se determinó para los flujos de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 3,0 ml/min.

6) Procedimiento: Las muestras preparadas como se indicó anteriormente (Secciones I y II) se inyectaron

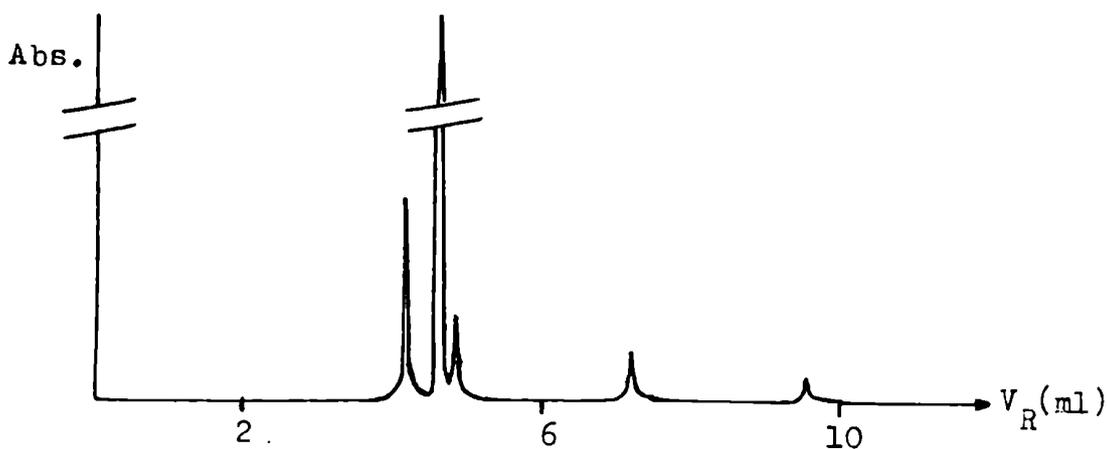


Figura 19: Cromatograma de las formas menos polares de 18-OH-B obtenido por CLAP usando fase móvil isocrática Metanol: Agua (70:30), Flujo 1 ml/min, y demás condiciones como se indica en Materiales y Métodos.

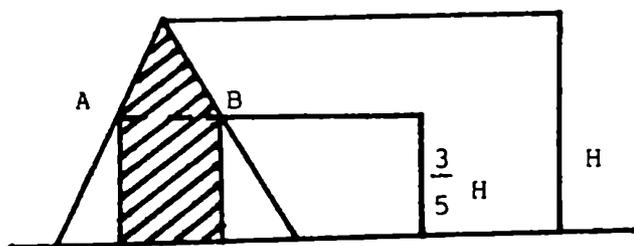


Figura 20: zona recolectada de cada pico.

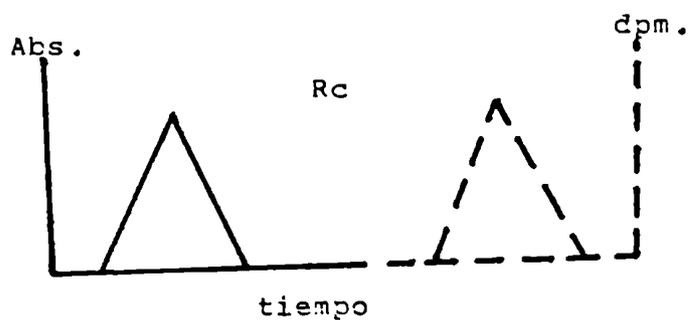


Figura 21: determinación de Rc como el intervalo entre el cromatograma del registrador (—) y el gráfico dpm-vs-fracción

en el cromatógrafo. La Figura 19 muestra un cromatograma típico obtenido. El cromatograma luego se alargó (mediante el aumento de la velocidad del registrador manteniendo el flujo de elución constante) y el material correspondiente a cada pico se recolectó, luego de tener determinado el R_c (Ver más adelante). Cada pico se colectó como se indica en la Figura 20 desde A hasta B. La pureza de cada fracción se determinó por recromatografía sucesiva de esta fracción en 5 fases móviles diferentes (Tabla 1) obteniéndose siempre un sólo pico. Cuando las muestras cromatografiadas se usaron luego para cromatografía en papel no se realizaron las recromatografías recién indicadas.

7) Estudios sobre óptima recuperación: Con el fin de recolectar solamente el material correspondiente a cada pico obtenido (sin perder radiactividad de la muestra y sin recolectar sólo fase móvil que aumentaría innecesariamente el volumen de cada fracción colectada dificultando el análisis posterior por cromatografía en papel) se hizo necesario determinar tan precisamente como fuera posible el intervalo de tiempo entre la señal del registrador y la salida del efluente correspondiente. A dicho tiempo lo denominamos R_c o Retardo de Colección. Esta determinación es importante cuando se trabaja con equipos no automati

T A B L A 1.

Fase Móvil	Indice de Polaridad
Metanol	6,6
Metanol-Agua (50:50)	7,8
Metanol-Agua (70:30)	7,3
Acetonitrilo	6,2
Acetonitrilo-Agua (85:15)	6,6

Fases móviles usadas en CLAP para la determinación de la pureza de fracciones recolectadas. $I_{xy} = V_x I_x + V_y I_y$, donde I_{xy} = Índice de polaridad; V_x y V_y son las fracciones volumétricas de los componentes x e y de la fase móvil; I_x y I_y índices de polaridad de los componentes x e y de la fase móvil (127).

zados, como ocurrió en este caso.

7 A) Determinación del Rc: Usando un flujo de 0,1 ml/min., el Rc se determinó inyectando en el cromatógrafo Corticosterona-¹⁴C (0,02 UCi en 20 U1), y colectando luego el efluente en fracciones cada 5 segundos entre la aparición de la señal en el registrador (o detector) (AS) y el fin de tal señal (FS) más cinco minutos. La radiactividad se contó en cada fracción por centelleo líquido y el gráfico de "dpm vs fracciones" se superpuso al cromatograma del detector. Como puede verse en la Figura 21 el Rc es igual al intervalo entre ambos gráficos. Para minimizar errores, la velocidad del registrador se expandió a 12.5 cm/min.

Luego se calculó una constante K igual a

$$K = Rc \cdot F_R$$

Como Rc resultó 228 ± 0.05 segundos; se obtuvo

$$K = 0,38 \text{ ml}$$

Por último el Rc se determinó para cada flujo (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 3,0 ml/min), de acuerdo a

$$R_c = \frac{K}{\text{flujo}}$$

K es característica para cada aparato y debe

ser definida como el volumen muerto entre la señal del detector y el dispositivo de salida de flujo. Consecuentemente R_c es el tiempo necesario para que una porción ideal de fase móvil avance através del volumen K a una dada velocidad de flujo.

También se ensayaron otros 2 métodos alternativos para la determinación del R_c , los cuales se indican en la Referencia (127).

7 B) Recuperación Cuantitativa: A distintos flujos (Tabla 2) se inyectaron muestras de ^{14}C -Corticosterona (0,02 μCi en 20 μl) y se recolectaron usando los R_c calculados como se indicó en la Sección anterior.

b) CLAP Preparativa.

1) Generalidades: Para este tipo de CLAP, usada en la separación de Aldosterona de su forma menos polar, se usó un equipo MICROMERITICS equipado con un sistema propulsor de solventes modelo 750, un inyector manual modelo 730 con un "loop" de 1 ml; y un detector de índice de refracción para monitorear el efluente.

Las columnas usadas fueron de 500 mm de longitud x 10 mm de diámetro interno, rellenas con fase reversa (Alltech R-Sil C-18 HL 10 μm).

2) Fase Móvil: La fase móvil usada fue Metanol- H_2O (70:30), y fue preparada con los mismos solventes de CLAP ANALITICA.

T A B L A 2.

Flujo (ml/min)	Rc (seg.)	dpm Agregadas	dpm Recuperadas	%
0.1	228	44600	44600	100
0.2	114	44600	44600	100
0.5	45.6	44600	44600	100
1.0	22.8	44600	44511	99.8
1.5	15.2	44600	44422	99.6
2.0	11.4	44600	44332	99.4
3.0	7.6	44600	44243	99.2

Recuperaciones de patrones (0,02 μ Ci en 20 μ l de $^{14}\text{C-B}$)
obtenidas cuando el Rc se calculó como en Estudios sobre
óptima recuperación.

3) Flujo: Se usó un flujo de 4 ml/min.

IV) GENERALIDADES METODOLOGICAS COMUNES A LOS EXPERIMENTOS DE INCUBACION DE ADRENALES DE RATA.

a) Animales.

Se usaron ratas macho entre 200 y 300 grs. de la cepa CHBB-Thom pertenecientes al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

b) Obtención, preparación y tratamiento del tejido.

Las ratas fueron decapitadas e inmediatamente se extrajeron las adrenales a las que, sobre hielo, se les quitó el tejido graso adherido. Las adrenales obtenidas fueron tratadas de una de las dos maneras siguientes:

1) Para Incubaciones de cuartos de adrenales: las glándulas se cuartearon y los cuartos se reunieron en grupos de peso requerido, teniendo en cuenta condiciones de muestreo que aseguren equivalencia entre los distintos grupos (138).

2) Para Incubaciones de homogenatos de adrenales: las glándulas se pesaron, se cuartearon; y los cuartos se homogenizaron en el buffer adecuado en la relación 200 mg de tejido/ 1 ml de buffer.

En ambos casos los medios biológicos fueron mantenidos en baño de hielo (4°C) hasta el momento de comenzar la incubación.

c) Soluciones buffer.

Las composiciones de las soluciones buffer variaron de acuerdo al valor de pH y al modo de preparación de las adrenales (cuartos u homogenatos). Independientemente de estas dos condiciones las soluciones buffers tenían:

NaCl	130	mM
ClK	5,2	mM
Cl ₂ Ca	2,6	mM
SO ₄ Mg	1,3	mM
Glucosa	11	mM

Además, para cada condición, la composición era: Para Incubaciones con cuartos de adrenales:

pH = 7,4 : buffer $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2\text{H}_2$ 13,5 mM

pH = 4,8 : buffer $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{CH}_3\text{COOH}$ 13,5 mM

pH = 3,3 : buffer $\text{PO}_4\text{H}_2^- / \text{PO}_4\text{H}_3$ 13,5 mM

Para Incubaciones con Homogenatos de adrenales:

pH = 7,4 : buffer Tris-HCl 13,5 mM

pH = 4,8 : buffer $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{CH}_3\text{COOH}$ 13,5 mM

En todos los casos la fuerza iónica fue de 0,57 moles^{1/2}.

d) Condiciones de las incubaciones.

Excepto en los casos indicados expresamente las incubaciones fueron realizadas en vasos de vidrio neutro Schott & Gen-Mainz de 10 ml de capacidad.

dad, en un incubador metabólico Dubnoff con agi
tación, a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno
(O₂ : CO₂ (95 : 5)). El volumen de los incubados
fue de 2 ml.

e) Disolución de los precursores.

Los esteroides usados, disueltos en tolueno
+ etanol (9 + 1), tanto radiactivos como radio-
inertes, se pipetearon en los vasos de incuba-
ción y se llevaron a sequedad bajo N₂ a temperau
tura ambiente. El residuo seco se tomó con 4 gou
tas de CH₂Cl₂ y 2 gotas de propilenglicol. Luego
se evaporó el CH₂Cl₂ bajo N₂ a temperatura ambien-
te, con lo que el esteroide quedaba disuelto en
el propilenglicol (PG). En el caso de usar homou
genatos como medio biológico, a la suspensión
del esteroide en PG, se le agregaba directamente
el volumen de homogenato correspondiente, el
cual se hallaba ya en el buffer adecuado. Cuando
el medio biológico consistió en cuartos de adreu
nales se agregaba el medio buffer al PG, y se
colocaban los vasos en el incubador a 37°C bajo
carbógeno durante 30 minutos. Cumplido este
tiempo se agregaban los cuartos de adrenales a
cada vaso de incubación.

Como método alternativo, los esteroides se
dejaron en residuo seco en los vasos de incuba-

ción, y sobre ellos se agregaron: o bien el buffer (30 minutos antes de agregar el medio biológico) o bien los medios biológicos directamente.

f) Agregados de otros compuestos a las incubaciones.

En casos particulares se agregaron otros compuestos a los medios de incubación: a) malato, NADP^+ y NADPH (Sección X de Materiales y Métodos) y b) ACTH (Sección XIII). Los compuestos del caso a) se disolvieron en los buffers; y la ACTH se agregó directamente al medio de incubación.

g) Tratamiento de los incubados.

Una vez finalizado el tiempo de incubación requerido en cada experimento los incubados se trataron de la siguiente manera:

1) Incubaciones con cuartos de adrenales:

El sobrenadante se volcó sobre 1 ml de Cl_2CH_2 y se extrajo 3 veces con 5 ml de Cl_2CH_2 por vez. El tejido adrenal de cada vaso de incubación fue homogeneizado con 2 ml de etanol al 20% en agua, y el homogenato obtenido se extrajo 3 veces con 5 ml de Cl_2CH_2 por vez. Los extractos clorometilénicos provenientes del sobrenadante y del tejido se juntaron; se llevaron a 10 ml a 37°C bajo N_2 , y se le agregaron $0,02 \mu\text{Ci}$ de Aldosterona-4- ^{14}C como trazador de pérdidas.

2) Incubaciones con homogenatos: Una vez finalizada la incubación el incubado se extrajo directamente con Cl_2CH_2 de la forma indicada para el sobrenadante de las Incubaciones con cuartos de adrenales. El extracto clorometilénico se llevó a 10 ml con N_2 a 37°C y se le agregaron $0,02 \mu\text{Ci}$ de Aldosterona-4- ^{14}C como trazador de pérdidas.

Cuando se quería medir la cantidad de la FMPA que se formaba en la incubación, también se agregaba como trazador FMPA- ^{14}C obtenida a partir de Aldosterona-4- ^{14}C como se indica en la Sección II. El extracto, con los trazadores, se denominó extracto inicial (EI). Luego del agregado de los trazadores se tomó una alícuota del 2% de EI para medir la radiactividad de ^3H y de ^{14}C . Luego se llevó a sequedad (37°C ; N_2) el resto del extracto orgánico. Cuando B era usada como precursor, el residuo seco obtenido se cromatografió primero en el sistema TPG. La metodología empleada se detalla más adelante.

En cambio, cuando los precursores fueron 18-OH-B y MAC el residuo seco se sembró sobre papel Whatman N° 1 y se desarrolló cromatográficamente en el sistema Bush B5. El cromatograma se reveló por radiocromatografía, y se evidencia

ron 6 picos con los siguientes Rfs: 0,12; 0,31; 0,52; 0,63; 0,75 y 0,93:

el pico de $R_f = 0,12$ coincide con la movilidad de 18-OH-B;

el de $R_f = 0,31$ con la movilidad de Aldosterona;

y los de $R_f 0,52; 0,63; 0,75$ y $0,93$ con los correspondientes a las 4 formas menos polares de la 18-OH-B obtenidas también químicamente a partir de 18-OH-B con HCl.

El material correspondiente a estos picos fue cuantificado (para Aldosterona) o bien semi-cuantificados según las técnicas que luego se detallan.

h) Determinación cuantitativa de Aldosterona tritiada.

Para la determinación cuantitativa de Aldosterona tritiada (Aldo-³H) se siguió la técnica descrita por Kliman y Peterson (128). Esta puede dividirse en 4 etapas.

1ª etapa: Obtención de Aldo impura.

En el cromatograma proveniente del sistema Bush B5, como ya se indicó recién, eran detectadas 6 zonas radiactivas, una de las cuales correspondía a la movilidad de Aldo: $R_f = 0,31$. Esta zona, denominada Aldo impura (Aldo-I) se eluyó con metanol (3 veces con 3 ml cada

vez). Se tomó luego una alícuota del 5% del extracto metanólico con el fin de medir la radiactividad en ^3H y ^{14}C .

2ª etapa: Obtención del derivado diacetilado (Figura 22).

El extracto metanólico remanente de Aldo-I se llevó a sequedad (37°C ; N_2) y se trató el residuo con 0,2 ml de Piridina y 0,2 ml de Anhídrido acético. Se agitó la mezcla y se mantuvo en oscuridad a 30°C durante 20 hs. Se agregaron a continuación 2 ml de metanol, se agitó y se mantuvo la solución 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se la llevó a sequedad (37°C ; N_2), y el residuo seco se sembró con Cl_2CH_2 sobre tiras de papel Whatman Nº 1 para ser desarrollado en el sistema CyDi I (128) (Ciclohexano + Dioxano + Metanol + Agua; 4 : 4 : 2 : 1) junto a un estándar radioinerte de 18,21-Diacetato de Aldosterona (18,21-DAA). Los cromatogramas obtenidos se revelaron por radiocromatografía excepto el del estándar de 18,21-DAA que se detectó por absorción al Ultravioleta (UV). Las zonas radiactivas correspondientes a la misma movilidad del estándar se eluyeron con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez), y el extracto metanólico se dividió en 2 partes de

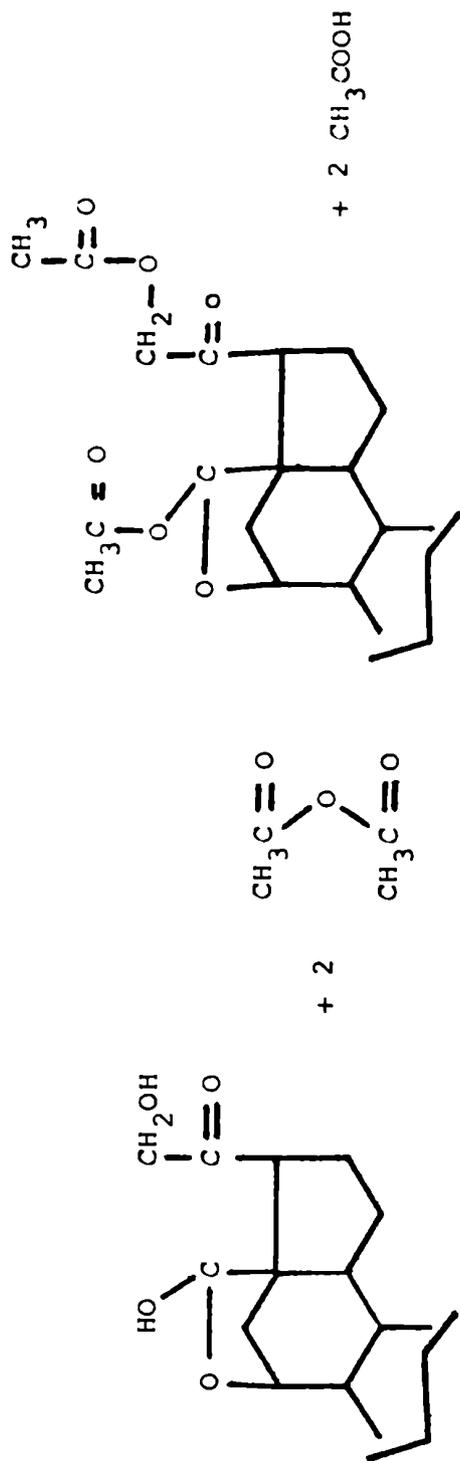


Figura 22: Reacción de diacetilación de Aldo.

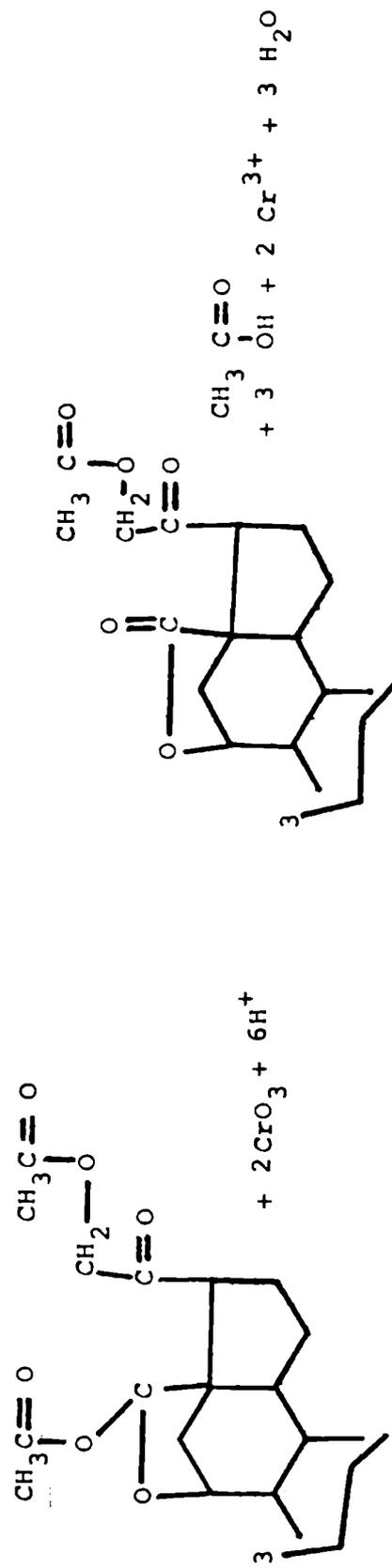


Figura 23: Reacción de oxidación para la obtención de la Lactona de Aldosterona.

10% y 90% respectivamente. A la primera se le midió radiactividad en ^3H y ^{14}C y al resto se lo llevó a sequedad (37°C ; N_2).

3ª etapa: Obtención de la lactona de la Aldosterona (Figura 23).

El residuo seco anterior se trató con 2 ml de solución de CrO_3 al 0,5% p/v en Acido Acético Glacial. Se agitó, se tapó y se dejó 15 minutos a 28°C en oscuridad. Pasado dicho período de tiempo se agregó 1 ml de H_2O destilada, se agitó, y la solución resultante se extrajo 3 veces con 6 ml de Cl_2CH_2 cada vez. El extracto clorometilénico se lavó 2 veces con 1 ml de H_2O cada vez, y se llevó a sequedad a 37°C bajo N_2 . El residuo seco se sembró sobre tiras de papel Whatman Nº 1 y se corrió en el sistema CyDi I. Los cromatogramas se revelaron por radiocromatografía y la zona radiactiva que contenía ^{14}C (la de mayor actividad radiactiva en el radiocromatógrafo) se eluyó con metanol. El extracto metanólico se dividió en dos porciones de 10 y 90% respectivamente. A la primera se le determinó la radiactividad en ^3H y ^{14}C y a la segunda se la llevó a sequedad a 37°C bajo N_2 .

4ª etapa: Verificación de la pureza de la lactona de Aldosterona.

El residuo seco se sembró sobre tiras de papel Whatman Nº 1 y se corrió en el sistema Ciclohexano + Benceno + Metnaol + Agua (4 : 3 : 4 : 1) (128). Los cromatogramas se revelaron por radiocromatografía y la zona radiactiva correspondiente al ^{14}C (la de mayor actividad) se eluyó con metanol. Al extracto metanólico se le redujo el volumen (N_2 ; 37°C) y se midió la radioactividad en ^3H y ^{14}C .

Con las medidas de radiactividad se obtuvo la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$; a partir de la cual, según el clásico método de dilución isotópica, es posible determinar:

1) Pureza de la Aldo- ^3H purificada: El criterio adoptado consiste en obtener constancia en la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ luego de 2 pasos sucesivos de purificación. En nuestro caso la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ se mantuvo constante luego de las cromatografías de la lactona en los sistemas CyDi I y Ciclohexano: Benceno: Metanol: H_2O ; y en varios casos también la constancia se verificó a partir del diacetato de Aldo.

2) Análisis Cuantitativo: El "%" de Aldo- ^3H producida en la incubación, se calculó tenien-

do en cuenta las pérdidas de Aldo-³H sufridas a través de los pasos de purificación desde el EI hasta la obtención de la relación ³H/¹⁴C constante. Esta evaluación de las pérdidas se efectuó con el uso de Aldo-¹⁴C como trazador.

i) Aldosterona de la forma menos polar de la Aldosterona: su purificación y cuantificación.

Se había establecido antes (Sección II) que la Aldosterona formaba la FMPA en medio HCl. Con el objeto de investigar si la FMPA se formaba en los medios de incubación usados, se estudió la composición del material correspondiente al pico de Rf = 0,93 de la cromatografía del EI del incubado en el sistema Bush B₅.

El material del pico de Rf = 0,93, se eluyó con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez) y se llevó a sequedad (N₂; 37°C). El residuo seco se tuvo 1 día en NH₃ 0,013 N, y se cromatografió sobre papel Whatman Nº 1 en el sistema Bush B₅. Se reveló el cromatograma por radiocromatografía, y se observaron 2 picos de Rf = 0,12 y Rf = 0,93. Las zonas radiactivas se cuantificaron por triangulación de los picos respectivos primero, y por conteo de la radiactividad luego de eluir el material de cada zona con 9 ml de Metanol. Los resultados indicaron así, que el

tratamiento en NH_3 revirtió parte del material de $R_f = 0,93$ a 18-OH-B, pero que en dicho pico había radiactividad que no revertía en NH_3 . La parte que revirtió se verificó que era la forma menos polar de la 18-OH-B obtenida en medio ácido (Ver Sección I). Al material del pico de $R_f = 0,93$ que no revirtió con NH_3 , se lo trató con 0,5 ml de KHCO_3 al 0,4% en metanol durante 8 hs. a 30°C , en atmósfera de N_2 y en oscuridad. Se agregó 1 ml H_2O y se extrajo con Cl_2CH_2 (3 veces con 4 ml cada vez). El extracto cloruro-metilénico se secó con Na_2SO_4 (anhidro) y se evaporó a 37°C bajo N_2 (139).

El residuo seco obtenido se cromatografió sobre papel Whatman Nº 1 en el sistema Bush B5; revelándose el cromatograma por radiocromatografía. Se evidenciaron así 2 picos de $R_f = 0,12$ y $R_f = 0,93$, concluyéndose que el material del $R_f = 0,93$ original (el proveniente del EI del incubado), contenía además un material saponificable, posiblemente un éster de 18-OH-B (MS).

El material radiactivo que permaneció inalterado luego de estos tratamientos con NH_3 y KHCO_3 , se eluyó del cromatograma con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez) y el extracto orgánico se llevó a sequedad bajo N_2 a 37°C . El residuo seco se cromatografió, sucesivamente, en

los sistemas Bush A y CiDi I obteniéndose en ambos casos, luego del revelado por radiocromatografía, un solo pico de $R_f = 0,13$ y $R_f = 0,78$ respectivamente. Como dichos R_f coincidían con los de la FMPA, se procedió a verificar tal identidad.

Para éso se cromatografió el material radiactivo aislado de los medios de incubación mezclado con la FMPA (obtenida por tratamiento de Aldo con HCl y separada por cromatografía sobre papel Whatman en el sistema Bush B5) en los siguientes sistemas cromatográficos:

1) Placa Delgada sobre sílica gel.

Fase Móvil = Benceno: Acetato de Etilo-2:1.

2) Placa Delgada sobre Sílica gel.

Fase Móvil = Hexano : Acetona-5:4.

3) Placa Delgada de Alta Performance sobre Sílica gel.

Fase Móvil = Benceno: Acetato de Etilo-2:1.

4) Placa Delgada de Alta Performance sobre RP-18.

Fase Móvil = Metanol : H₂O (70 : 30)

5) Cromatografía Líquida de Alta Presión con fase reversa (μ -Bondapak = C-18).

Fase Móvil = Metanol : H₂O (70 : 30).

En los sistemas cromatográficos del 1) al 4) se reveló la placa por absorción a la luz UV, y se eluyó la zona correspondiente a la presencia de absorción y el resto de la placa con Metanol. De cada extracto metanólico se tomó una alícuota para medir la radiactividad en ^3H . En todos los casos se obtuvo como resultado que la radiactividad se hallaba sólo en la zona donde se producía la absorción de la luz UV.

En el caso del sistema cromatográfico 5) se colectó la zona correspondiente al pico de la FMPA (Tiempo de retención = 16.2 minutos) y el resto del eluido, en fracciones de 1 ml. A las fracciones colectadas se las llevó a sequedad (N_2 ; 37°C o bajo vacío), y se les midió la radiactividad. Así se evidenció que la única fracción colectada que tenía radiactividad era la correspondiente a la colección del pico de la FMPA. Sobre la CLAP aquí descrita cabe señalar que la colección del pico de la FMPA se realizó según las Condiciones Optimas de recolección que aseguran el 100% de recuperación según los estudios llevados a cabo al respecto (Ver Sección III), y que en el cromatograma aparecieron, además del pico principal que correspondía a la FMPA, otros picos de menor tamaño característicos de cuando se cromatografía por CLAP,

algún material proveniente de una elución de papel.

Por último, la mezcla FMPA radioinerte + material radiactivo de $R_f = 0,93$ inalterable con NH_3 y KHCO_3 ; se recristalizó de éter etílico-heptano, midiéndose la Actividad específica luego de cada recristalización hasta constancia.

De esta manera se concluyó que el material radiactivo aislado por cromatografía en papel luego de tratamientos con NH_3 y KHCO_3 correspondía a la FMPA, que se había formado durante la incubación. Por lo tanto, como se sabía que la FMPA estaba en equilibrio con Aldo, y como era Aldo la que se quería cuantificar, se procedió a cuantificar la FMPA formada durante la incubación, y su valor se sumó al correspondiente a Aldo obtenido según el método de Kliman y Peterson descripto más arriba.

Para efectuar la cuantificación de la FMPA formada durante la incubación se usó, lo mismo que para Aldo, el método de dilución isotópica. De la cromatografía del EI en el sistema Bush B5 (Ver Tratamiento de los Incubados) se aisló el material del pico de $R_f = 0,93$, el cual se lo trató con NH_3 y con KHCO_3 tal como se mencionó antes, con la única variación de tomar ahora alícuotas de los eluidos de las cromatografías

luego de cada tratamiento, con el fin de medir la radiactividad en ^3H y ^{14}C .

El material inalterado por NH_3 y KHCO_3 , se cromatografió en el sistema CyDi I (128) o Bush A (140) y el material del único pico observado por radiocromatografía se eluyó con Metanol. Del extracto metanólico se tomó el 50% para medir la radiactividad en ^3H y ^{14}C .

Con las medidas de ^3H y ^{14}C iniciales y finales (FMPA pura) se procedió a sacar el % de FMPA teniendo en cuenta las pérdidas sufridas por dicho compuesto.

j) Aldo total.

Así, finalmente, luego de determinar el Aldo- ^3H según Kliman y Peterson y la FMPA- ^3H por esta metodología recién descripta; se calculó el % Aldosterona total formada durante la incubación como:

$$\% \text{ Aldo TOTAL} = \% \text{ Aldo-}^3\text{H} + \% \text{ FMPA-}^3\text{H}$$

Semicuantificación de otros productos.

Aparte de cuantificarse Aldosterona como producto de las incubaciones; también se semicuantificaron otros compuestos:

k) Forma menos polar de 18-OH-B de $R_M = 7.18$.

La forma menos polar de 18-OH-B de R_M 7.18,

se purificó a partir del material de $R_f = 0,93$ obtenido en la cromatografía del EI en el sistema Bush B₅. Dicho material fue tratado con NH_3 0,013 N, medio en el que demostró revertir totalmente a 18-OH-B, tal como se indica en Resultados. Luego de 24 hs se neutralizó con HCl y se cromatografió en el sistema Bush B₅. Se detectó luego la 18-OH-B; se eluyó, el extracto se llevó a sequedad y el residuo seco se trató con HCl 10^{-2} N; cromatografiándose el producto sobre papel Whatman Nº 1 en el sistema Bush B₅. Por radiocromatografía se evidenciaron 5 picos con R_f s e intensidades que seguían el patrón obtenido en la producción de las formas menos polares de la 18-OH-B, lo cual hablaba en favor de la pureza e identidad de la R_M 7.18 revertida a 18-OH-B.

Para la semicuantificación del R_M 7.18 producido durante la incubación se asumió que este compuesto sufría en la cromatografía en Bush B₅ del EI las mismas pérdidas que la FMPA; y que en la reversión de R_M 7.18 a 18-OH-B con NH_3 se volvía a producir la misma pérdida. Por lo tanto, como dicha pérdida se había calculado para la cuantificación de la FMPA, (Ver punto 1) más arriba), se pudo semicuantificar el R_M 7.18.

l) Material saponificable con KHCO_3 (MS).

MS se purificó y semicuantificó a partir del material radiactivo del pico de Rf 0.93 obtenido en la cromatografía del EI.

Este material saponificable se purificó luego de haberse separado con NH_3 el R_M 7.18 también contenido en el Rf = 0.93. Por tratamiento del material residual con KHCO_3 tal cual se describió en la cuantificación de Aldosterona de la FMPA, se obtuvo 18-OH-B de MS.

De la radiactividad total del material del pico de Rf 0.93 de la cromatografía en Bush B₅ del EI se restaron: la radiactividad de la FMPA ya cuantificada y la radiactividad de la R_M 7.18 semicuantificada, teniendo en cuenta las pérdidas sufridas por esos compuestos hasta dicho paso de purificación.

El valor de radiactividad remanente se asignó a MS. A dicho valor se le aplicaron las pérdidas sufridas por la FMPA, y así finalmente se obtuvo el valor de radiactividad del MS en EI.

m) 18-OH-B forma M.

Este compuesto se semicuantificó a partir del material radiactivo del pico de Rf = 0.12 obtenido en la cromatografía del extracto inicial del incubado.

Para verificar que dicho material correspondía sólo a 18-OH-B, se lo eluyó con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez) y el extracto orgánico obtenido se llevó a sequedad a 37°C bajo N_2 . El residuo seco se trató con $HCl\ 10^{-2}\ N$ durante 10 minutos, y se sembró sobre tiras de papel Whatman Nº 1, para cromatografarlo luego en el sistema Bush B_5 . Por radiocromatografía se revelaron 5 picos con movilidades e intensidades relativas iguales a las obtenidas con el mismo procedimiento sobre 1,2- 3H -18-OH-B patrón.

Verificada la pureza del material de $R_f = 0.12$, éste se semicuantificó asumiendo que la 18-OH-B había sufrido las mismas pérdidas que la Aldosterona - ^{14}C hasta la cromatografía en el sistema Bush B_5 .

n) 18-Desoxialdosterona.

este compuesto se semicuantificó a partir del material radiactivo del pico de $R_M = 4,33$ ($R_f = 0.52$) obtenido en la cromatografía del EI del incubado en el sistema Bush B_5 .

Para verificar que dicho material correspondía sólo a 18-DAL, se le eluyó con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez) y el extracto metanólico se llevó a sequedad a 37°C bajo N_2 . Este

residuo seco, paralelamente a otro de 18-DAL-³H estandard obtenido por suspensión de 18-OH-B en HCl (Ver Sección I de Materiales y Métodos), se trató con 0,2 ml de piridina y 0,2 ml de Anhídrido Acético (128) durante 20hs a 37°C. Luego se agregaron 2 ml de metanol y a los 10 minutos se llevó el extracto a sequedad (N₂; 37°C). Los residuos secos finalmente obtenidos se sembraron sobre papel Whatman N° 1 junto a estandard radio inerte de 18-DAL-21-Acetato, y se cromatografiaron en el sistema Bush B₁ (140). Los cromatogramas provenientes de 18-DAL-³H y del material radiactivo del pico de Rf = 0.52 se revelaron por radiocromatografía evidenciándose en ambos casos el pico de Rf = 0,58, coincidente con la posición del estandard de 18-DAL-21-Acetato revelado por absorción a la luz U.V.

Finalmente, el material radiactivo del Rf = 0,52 se sometió, junto a 18-DAL-³H, a las pruebas de reversibilidad en residuo seco y en NH₃ 0.013 N descriptos en la Sección I de Materiales y Métodos para las formas menos polares de la 18-OH-B. Por comparación de los resultados observados entre las muestras y 18-DAL, se concluyó que existía identidad entre ambos.

Una vez comprobada la identidad, se procedió a semicuantificar la 18-DAL-³H formada duran

te la incubación. Para ello se asumió que la 18-DAL-³H producida había sufrido las mismas pérdidas que la Aldosterona-¹⁴C hasta esta misma etapa.

o) Otras formas menos polares de la 18-OH-B.

Hasta aquí se indicó la semicuantificación de dos de las cuatro formas menos polares de la 18-OH-B producidas durante la incubación, las de R_M 7,18 y de R_M 4,33. Para las dos restantes de R_M 5.26 y R_M 6.33 (R_f s 0,63 y 0,75 respectivamente) la identificación y la posterior semicuantificación se hicieron a partir de los materiales radiactivos de los mismos valores de R_f que los arriba indicados, presentes en el cromatograma del EI del incubado.

Para su identificación se hicieron las pruebas de reversibilidad en residuo seco y en NH_3 0,013 N contra patrones de las mismas formas menos polares de la 18-OH-B a identificar, obtenidas a partir del tratamiento de 18-OH-B con HCl 10^{-2} N, tal como se ha descrito en la sección I. Entonces, comparando los porcentajes de reversión a 18-OH-B forma M de los estándar y de las muestras, se concluyó que había identidad entre ambas, asumiéndose así que los materiales de los picos de $R_f = 0,63$ y $R_f = 0,75$ de la

cromatografía en Bush B₅ del EI del incubado correspondían a las dos formas menos polares de la 18-OH-B de idénticos Rfs.

La semicuantificación se realizó de la misma manera que para la 18-DAL, asumiendo la igualdad entre las pérdidas sufridas por ambos compuestos y la Aldo-¹⁴C hasta la misma etapa.

p) Medición de radiactividad.

Para la medición de la radiactividad sobre alícuotas de distintas fracciones las muestras se pipetearon en viales de bajo contenido en potasio, y luego se evaporó el solvente hasta sequedad bajo corriente de aire o en desecador bajo vacío. Los residuos secos se disolvieron en 10 ml de líquido centelleador de la siguiente composición: solución en tolueno de 0,4% p/v de PPO (2,5-difeniloxazol) y 0,025% p/v de dimetil POPOP (1,4-bis 2-(4-metil-5-feniloxazolil) benceno).

Las muestras así preparadas se contaron en un Contador de Centelleo Líquido Tracer Analytic modelo MARK III conectado a una terminal ITT.

Este aparato procede de forma diferente según se trate de medir un isótopo ó 2 isótopos.

En el caso de que se trate de la medición de un só lo isótopo el aparato mide previamente una curva de calibración consistente en una serie de muestras standards que contienen cada una la misma actividad radiactiva pero

diferente grado de "quenching" (141). Para cada muestra el contador mide las cpm, la eficiencia y el grado de "quenching", y establece y adopta un "setting" óptimo de grillas voltaicas, incorporándose automáticamente toda esta información a la computadora. La medición del grado de "quenching" de una muestra cualquiera es entonces efectuada por el contador de la siguiente manera: mide la actividad radiactiva de un estándar externo en presencia y en ausencia de la muestra a medir. El impulso eléctrico proveniente de cada medición es luego rectificado a una onda cuadrada de base constante. De esta manera, el cociente de las alturas de ambas ondas expresa el factor de "quenching".

Una vez incorporadas las curvas de calibración de ambos isótopos, se midió la radiactividad de las muestras experimentales. Para éso, el aparato mide el grado de "quenching" de cada muestra y lo corrige en base a las condiciones del estándar más próximo. Este método consigue medir el grado de quenching de cada muestra por separado, es decir que aplica una eficiencia propia al valor de cpm de cada muestra.

El problema de llegar a relación constante en los métodos de dilución de isótopos con formación de derivados y las posibilidades de corregir "quenching" en estos casos: En el caso de dos isótopos el problema se complica por la necesidad de tener que tener en cuenta, en una mis-

ma muestra desconocida, no sólo la eficiencia de ambos isótopos sino también el diferente grado de penetración del isótopo de mayor energía en el campo del de menor energía.

El problema llega a su complicación máxima cuando las comparaciones se deben efectuar entre relaciones isotópicas de estructuras químicas diferentes características de cada uno de los pasos analíticos de un método de dilución isotópica con formación de derivados de doble marcación.

En este último problema el "quenching" tiene tres tipos de consecuencias: 1) disminución de la eficiencia de una sólo o de las dos marcaciones isotópicas; 2) corrimiento del espectro del isótopo de mayor energía hacia los campos del de menor energía; 3) modificación en el grado en que cada agente quencheante es sensible a los dos factores anteriores debido al cambio de estructura molecular que sufre la molécula esteroidea entre un paso y otro. (Para la influencia de la estructura esteroidea y de la posición de la marcación sobre el "quenching" ver (142)).

Estos factores imponen entonces un método que no se contente con corregir una o ambas eficiencias sino que debe corregir también, para cada muestra, el "setting" de las grillas voltaicas tendientes a eliminar energía proveniente de isótopos foráneos.

El establecimiento, para cada muestra, de ganan-

cias y grillas óptimas es un problema tan tedioso que resulta imposible en aparatos no computarizados y no programados para tal fin.

El equipo que se utilizó en mi tesis, sin embargo, consigue establecer ganancias y discriminaciones de grillas óptimas debiéndose a este perfeccionamiento la buena coincidencia de relaciones de isótopos entre el penúltimo y último paso del método de doble isótopo con derivatizaciones empleado para la Aldo.

V) A) EXPERIMENTOS SOBRE CAPACIDAD PRECURSORA DE M Y MAC PARA ALDOSTERONA.

a) Con el objeto de estudiar la capacidad precursora para Aldo de 18-OH-B (forma "M") y de MAC (mezcla de compuestos obtenidos al suspender 18-OH-B forma M durante 10 minutos en HCl 10^{-2} N; ver Sección I) se realizaron los siguientes experimentos:

0,8 μ Ci de 1,2- 3 H-18-OH-B o de MAC- 3 H se incubaron en presencia o ausencia de 100 ± 5 mg de cuartos de adrenales. Las variables de cada incubación fueron:

- 1) Precursores: como ya se indicó fueron 1,2- 3 H-18-OH-B ó MAC- 3 H (0,8 μ Ci de cada uno).
- 2) Tejido Adrenal: como ya se indicó cada incubación se realizó en presencia (Biótica) o ausencia (Abiótica) de 100 ± 5 mg de cuartos de adrenales de rata.
- 3) pH del medio de incubación: se usaron medios buffers de pH= 3,3 ó 4,8 ó 7,4, cuyas composiciones se hallan en la Sección IV.
- 4) Tiempo de incubación: las incubaciones se realizaron durante 1 h. ó 2 hs.
- 5) Preincubación: cada incubación se realizó con Preincubación o sin Preincubación. Las incubaciones con preincubación consistían en incubar los cuartos de adrenales en medio buffer sin precursores radiactivos durante 20 minu-

tos; y luego tomar las glándulas y pasarlas a otro recipiente con el mismo medio buffer que contenía ahora el precursor radiactivo requerido. Resulta obvio que en aquellos experimentos en los que no se usó tejido adrenal, no existió la posibilidad de efectuar la preincubación.

Cabe destacar que los ensayos realizados en ausencia de tejido adrenal, se realizaron para evaluar la conversión espontánea de 18-OH-B y MAC A Aldo bajo las condiciones de los ensayos ya que, para el lero. de los precursores, dicho tipo de transformación ya ha sido reportada (7).

Finalmente se realizaron 36 incubaciones por triplicado, en las cuales cada una difería de la otra en alguna de las cinco variables 1) a 5) señaladas más arriba, midiéndose en cada una la Aldosterona tritiada producida. También se cuantificaron otros compuestos, tal como se indica en Resultados.

b) Tratamiento estadístico: para cada incubación se definió la variable $x = \% \text{ de Aldosterona-}^3\text{H}$ producida durante la incubación; y se calculó el \bar{x} y el error estándar (EE).

Luego se realizó un tratamiento estadístico entre todos los valores \bar{x} y EE informados, conjuntamente con

los correspondientes a las incubaciones del experimento siguiente (Sección V-B), relacionado, como se verá, con el aquí descrito.

V) B) EXPERIMENTOS SOBRE CAPACIDAD PRECURSORA DE M Y MAC, INCLUIDOS EN LIPOSOMAS, PARA ALDOSTERONA.

a) Con el objeto de estudiar si la alta polaridad de la 18-OH-B (M) y sus derivados menos polares (MAC) afectaba la entrada de las hormonas al tejido, se incorporaron éstas a liposomas obtenidos a partir de tejido graso de adrenal y luego se incubaron con las adrenales. Desde otro punto de vista se pensó, que estando los lípidos involucrados en gran cantidad de procesos metabólicos, (143) (144), ellos podrían afectar la biosíntesis de la hormona lipídica Aldosterona.

Los estudios realizados con las hormonas incluidas en liposomas responden exactamente a los experimentos sobre capacidad precursora de M y MAC para Aldosterona (Sección V-A), en cuanto a la misma variación de condiciones 1 a 5, ya detalladas en esa Sección.

Es decir que se realizaron 36 incubaciones por triplicado en las cuales cada una difería de la otra en alguna variable de las indicadas más arriba.

Luego de finalizada cada incubación se cuantificó la Aldosterona tritiada producida, como así también otros productos tal como se indica en Resultados.

b) Tratamiento estadístico: de los valores obtenidos por

triplicado en cada incubación se calculó, al igual que en el experimento anterior, el \bar{x} y el EE de la variable $x = \%$ de Aldosterona producida.

c) Formación de liposomas: la formación de liposomas fue obtenida de acuerdo a las metodologías descriptas por Abramson y colab. (145) y por Saunders y colab. (146), a partir de grasa adrenal.

c₁) Obtención de grasa adrenal: 12 adrenales de rata se homogeneizaron con etanol acuosa al 20% v/v, y el homogenato se extrajo dos veces con el triple de volumen de Cl_2CH_2 . El solvente orgánico se evaporó bajo nitrógeno, a 37°C, y el residuo obtenido se suspendió en 3 ml de metanol. El extracto metanólico se dejó toda la noche a 4°C en heladera, y se decantó. Todos los lípidos precipitados se disolvieron en 1 ml de Cl_2CH_2 y 1 ml del buffer que iba a ser usado (pHs 3,3 ó 4,8 ó 7,4) en la incubación posterior. Se evaporó en corriente de N_2 el solvente orgánico y los lípidos quedaron así suspendidos en la solución buffer. La suspensión se sonicó durante 20 segundos en un equipo "Cell Disrupter" (Modelo 185 D. Heat System Ultrasonic Inc., Rahway, N. J.) a 130 watts/cm². La formación de liposomas por sonicación se chequeo por observación al microscopio con aumento de 1000 x, y por la estabilidad de la suspensión formada.

c₂) Incorporación de los precursores a los liposomas:
de la suspensión de los liposomas formados como recién se indicó, se tomaron 2 ml y a ellos se agregó 0,3 ml de MAC-³H en HCl 10⁻² N o de M-³H en el buffer que se usaba en la incubación, que como se recordará era el mismo medio de la suspensión de liposomas. Luego se agitó vigorosamente durante 30 segundos cada suspensión y se colocó a 37°C con agitación en un incubador metabólico Dubuoff, durante 10 minutos. Terminado dicho tiempo se comprobó la incorporación de radiactividad a los liposomas de dos modos:

PRIMERO: la suspensión se centrifugó a 5000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Se separaron el sobrenadante y el precipitado y sobre alícuotas de cada uno de ellos se midió la radiactividad, viendo el % de la radiactividad total que estaba en el precipitado, el cual se asignó a los liposomas.

SEGUNDO: la suspensión se pasó por una columna de Sephadex G-25, usando el buffer de incubación como fase móvil, y recogiendo el eluato en fracciones de 1 ml. Luego en cada fracción se midió la radiactividad, graficándose ésta en función de los ml eluidos. En el cromatograma así obtenido se observaron 2 picos de volúmenes de retención 6 ml y 18 ml. Se calculó la radiactividad de cada uno y se sacó el % de actividad radiactiva total que correspondía al pico de V_r , el cuál se asignó a los liposomas marcados. Compárese con (145).

De ambas formas de comprobación, se dedujo que no menos del 95% de la radiactividad se hallaba incorporada a los liposomas.

TRATAMIENTO ESTADISTICO CONJUNTO: Los resultados de los experimentos sobre capacidad precursora para Aldosterona de M y MAC en forma libre o incorporadas a liposomas (Secciones V-A y V-B), se juntaron como un único experimento, exceptuando los datos correspondientes a Preincubación.

Los datos de ambos tipos de experimentos se dividieron luego en "5 factores estadísticos", que se correspondían con las variables o condiciones de cada incubación, a saber:

1^{er.} factor: Precursor:

M-³H ó MAC-³H

2^{do.} factor: Tejido Adrenal: presencia (Biótico) o ausencia (Abiótico) de 100 ± 5 mg de tejido adrenal.

3^{er.} factor: pH del Medio de Incubación: buffer de pH 3.3; 4.8 ó 7.4

4^{to.} factor: Tiempo de Incubación: 1 h. ó 2 hs.

5^{to.} factor: Estado del precursor: Libre o encerrado en Liposomas.

Luego, con los factores así categorizados, se realizó un Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA de 5 factores). Con este fin los datos se procesaron

con una computadora VAX 11/750 perteneciente al Instituto de Cálculo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; determinándose la significación de los datos; las interacciones entre los factores y las condiciones óptimas de biosíntesis de Aldosterona con los factores usados.

VI) EXPERIMENTOS DE DILUCION DE MAC-³H CON 18-DAL RADIO-
INERTE.

Conociendo que MAC era una mezcla de varios compuestos (Sección I) con 18-DAL como principal componente (Resultados); y viendo que MAC tenía propiedades precursoras para Aldosterona (Secciones V-A y B, y Resultados); se estudió si el compuesto del MAC responsable de dicha capacidad precursora era 18-DAL. La suposición de esta identidad se basaba en que: 1) en estudios anteriores (7) a los realizados en la presente tesis, el componente R_M 4.33 del MAC, identificado por nosotros como 18-DAL (Resultados) presentó capacidades precursoras muy semejantes a las obtenidas por nosotros con MAC a pH 7.4, sin preincubación.

2) Los experimentos de Captura y de Curso de Reacción (Ver más adelante) indican que 18-DAL es intermediario en la biosíntesis de Aldosterona.

Con el fin indicado se incubaron 0,8 μ Ci de MAC-³H con cantidades crecientes de 18-DAL radioinerte, bajo las siguientes condiciones:

- a) 100 \pm 5 mg de cuartos de adrenales a pH = 4,8 durante 2 hs., sin preincubación.
- b) 100 \pm 5 mg de cuartos de adrenales a pH = 7,4 durante 2 hs., sin preincubación.

Estas condiciones coinciden con las más favorables para la biosíntesis de Aldosterona a partir de 18-OH-B,

según puede verse en Resultados.

Luego de efectuadas las incubaciones se procedió a determinar Aldosterona y 18-DAL tritadas como se indicó en la Sección IV.

VII) ESTUDIOS SOBRE CAPACIDAD PRECURSORA PARA ALDOSTERONA DE OTROS PRECURSORES.

Los estudios sobre capacidad precursora para Aldosterona hasta aquí desarrollados comprendieron como sustratos 18-OH-B y 18-DAL.

Sobre la base de esos experimentos se realizaron luego estudios sobre capacidad precursora para Aldosterona que comprendieron otros sustratos tales como:

- a) Otras formas menos polares de 18-OH-B.
- b) Material saponificable a 18-OH-B.

a) Como se indicó en la primera parte de esta Sección de Materiales y Métodos, y como puede verse en Resultados, el tratamiento de 18-OH-B con HCl formaba 4 "formas menos polares de 18-OH-B", una de las cuales, la mayoritaria de $R_M = 4.33$, fue identificada como 18-DAL. A las restantes formas menos polares ($R_M = 5.26$; 6.33 y 7.18) se les probó la capacidad precursora para Aldosterona, de la siguiente manera: $0,005$ a $0,02$ μCi de cada forma menos polar se incubaron con 100 ± 5 mg de cuartos de adrenales de rata a $\text{pH} = 7,4$ a 37°C durante 120 minutos. Finalizada la incubación el sobrenadante y las glándulas se trataron como en las incubaciones con 18-OH-B, (Sección IV) determinándose finalmente la Aldosterona producida.

a₁) Preparación de los Precursores: Las distintas formas menos polares de la 18-OH-B usadas como precursores se prepararon por suspensión de $1,2\text{-}^3\text{H-18-OH-B}$ en HCl, y se

separaron por cromatografía en papel en el sistema Bush B₅. Las zonas radiactivas correspondientes a cada forma menos polar se detectaron por radiocromatografía, y se eluyeron con metanol. El extracto metanólico se llevó a 1 ml y de él se tomaron 0,8 ml, los cuales se pusieron en el vaso de incubación y luego se llevaron a sequedad, primero bajo N₂ a 37°C y luego bajo vacío a temperatura ambiente. El residuo seco se usó como precursor, y a él se le agregaron 2 ml del medio buffer, y 30 min. después los cuartos de adrenales, dándose en ese momento por comenzada la incubación.

Los 0,2 ml restantes del extracto metanólico se llevaron a sequedad bajo las mismas condiciones anteriores y al residuo seco se le agregó 1 ml de medio buffer. Se dejó 60 minutos a 37°C con agitación esporádica y luego se trató como el sobrenadante de incubación, excepto que no se le agregó 4-¹⁴C-Aldosterona al extracto cloruro metilénico. Este último tratamiento tenía por objeto ver el estado del precursor en la mitad de la incubación; y servir como medida de las transformaciones químicas (o Abióticas) que el precursor usado podía sufrir.

Los experimentos se realizaron por duplicado.

b) En las incubaciones a partir de 18-OH-B y 18-DAL, se pudo observar que al hacer la cromatografía de los extractos de los incubados en el sistema Bush B₅, aparecía en el revelado, un pico de R_f = 0.93. El material de esta

zona radiactiva, se estudió químicamente como se indicó en la Sección IV, pudiéndose finalmente establecer que uno de los componentes era un "material saponificable" o "MS", postulándose que fuese un posible "éster de 18-OH-B".

Dicho MS se utilizó como precursor para Aldosterona. Con tal fin 0,1 μ Ci de MS se incubaron sin y con 100 ± 5 mg de cuartos de adrenales de rata a: pH= 7,4 y 4,8, a 37°C, durante 60 minutos o 120 minutos en ausencia y presencia de 18-OH-B radioinerte. Finalizada la incubación el sobrenadante y las glándulas se trataron como en a) para determinar 18-OH-B; Aldosterona; 18-DAL y MS, según las metodologías descritas en la Sección IV de Materiales y Métodos.

b₁) Preparación del Precursor: El MS radiactivo para usar como precursor fue obtenido luego de muchas incubaciones con 18-OH-B-³H de las cuales se aisló MS de la forma descrita en la Sección IV.

Los experimentos se realizaron por duplicado.

VIII) EXPERIMENTOS SOBRE CURSO DE LA REACCION DE PRODUCCION DE ALDOSTERONA A PARTIR DE B Y DE 18-OH-B.

Con el objeto de estudiar la posible secuencia de formación de intermediarios a partir de 18-OH-B (forma M) para la biosíntesis de Aldosterona, se realizó un experimento de "Curso de reacción" consistente en cuantificar el precursor, el producto final, y los intermediarios que eran separados por cromatografía en papel.

El experimento consistió en incubar 0,8 μ Ci de 1,2-³H-18-OH-B (Curso de Reacción a partir de 18-OH-B) con 100 \pm 5 mg de cuartos de adrenales de rata, a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno (95% O₂ + 5% O₂) en buffer de pH 7,4 y 4,8. Los tiempos de incubación fueron 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. El experimento se realizó por duplicado.

Finalizadas las incubaciones se procedió a cuantificar, a partir de las glándulas y del sobrenadante de incubación, 18-OH-B (forma M), 18-DAL, y la Aldosterona total.

Los detalles de incubación así como las metodologías de cuantificación, se hallan descriptas en la Sección IV.

IX) EXPERIMENTOS DE ATRAPAMIENTO.

- a) Experimento de atrapamiento de 18-OH-B radiactiva a partir de 1,2-³H-Corticosterona en la biosíntesis de Aldosterona.

Con el fin de determinar si la 18-OH-B actúa como intermediario de la biosíntesis de Aldosterona a partir de Corticosterona en adrenal de rata, se realizaron los siguientes experimentos:

(100 ± 5) mg de cuartos de adrenales de rata fueron incubados a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno, durante 1,5 hs., a pH = 4,8 con 25 pmoles de 1,2-³H-Corticosterona (1 µCi) y cantidades crecientes de 18-OH-B-(forma M)-radioinerte. Cada experimento se realizó por duplicado. En todos los casos se cuantificó Aldosterona-³H.

- b) Experimento de atrapamiento de 18-Desoxialdosterona radiactiva a partir de 1,2-³H-Corticosterona en la biosíntesis de Aldosterona.

Con el objeto de determinar si el esteroide 18-Desoxialdosterona era intermediario en la biosíntesis de Aldosterona a partir de Corticosterona en adrenal de rata, se realizaron los siguientes experimentos:

100 ± 5 mg de cuartos de adrenales de rata se incubaron a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno, durante 1,5 hs., a pH 4,8 con 25 pmoles de 1,2-³H-Corticosterona (1 µCi) y cantidades crecientes de 18-Desoxialdosterona ra

radioinerte. Cada experiencia se realizó por duplicado. En todos los casos se cuantificó Aldosterona-³H y se semicuantificó 18-OH-B-³ y 18-DAL-³H.

c) Experimento de atrapamiento de 18-Desoxialdosterona radiactiva a partir de 1,2-³H-18-OH-B en la biosíntesis de Aldosterona.

Con el objeto de determinar si 18-DAL era intermediario en la biosíntesis de Aldosterona a partir de 18-OH-B en suprarrenal de rata, se efectuaron los siguientes experimentos: 100 ± 5 mg de cuartos de adrenales de rata se incubaron a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno, durante 1,5 hs., a pH = 4,8 con 25 pmoles de 1,2-³H-18-OH-B (1,3 µCi) y cantidades crecientes de 18-DAL radioinerte. Cada experimento se realizó por duplicado. En todos los casos se cuantificó Aldosterona-³H y se semicuantificó 18-DAL-³H.

Tratamientos de los incubados con B como precursor.

La cuantificación de la Corticosterona-³H remanente se llevó a cabo por el método de dilución isotópica ya empleado para Aldosterona.

Con tal fin, al extracto clorometilénico proveniente de las glándulas y del sobrenadante de incubación (EI) se le agregaron 0,02 UCI de ¹⁴C-Aldo como trazador de pérdidas. Luego se llevó el extracto orgánico a sequedad bajo N₂ a 37°C y el residuo seco se sembró sobre papel Whatman N° 1 previamente embebido en una solución de Metanol:propilenglicol (2 + 1) y se desarrolló en el sistema cromatográfico TPG (147) (fase móvil = tolueno saturado con propilenglicol) durante 8 hs. El cromatograma se reveló por radiocromatografía, evidenciándose un pico en el origen y otros picos totalmente resueltos cerca de la mitad de la tira. Los R_f, algunas veces, no pudieron ser calculados ya que bajo las condiciones usadas la fase móvil comenzaba, a veces, a gotear fuera del cromatograma.

El origen se eluyó con Metanol (3 veces con 3 ml cada vez) y el extracto metanólico obtenido se llevó a sequedad (N₂, 37°C) para ser desarrollado luego sobre papel Whatman N° 1 en el sistema Bush B₅. A partir de este cromatograma se cuantificó Aldo, 18-OH-B y 18-DAL de la forma indicada en la Sección IV.

Los otros picos del cromatograma provenientes del TPG se compararon contra estándar de Corticosterona radioinerte. El que se correspondió con este último (el de

menor Rf) se eluyó y se cuantificó como Corticosterona-³H remanente por el método, ya mencionado, de dilución isotópica.

Finalmente, del último pico del TPG inicial se eluyó su material radiactivo con metanol. El extracto metanólico se llevó a sequedad y se sembró sobre papel Whatman Nº 1, desarrollándose en el sistema Bush B₅. El único pico obtenido se identificó como la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 6.33

X) EXPERIMENTOS DE REQUERIMIENTOS PARA LAS OXIDACIONES DE 18-OH-B Y 18-DAL PARA DAR ALDOSTERONA.

Con los experimentos de "atrapamiento o captura" y los de "Curso de reacción" a partir de B y 18-OH-B se pudo demostrar (Ver Resultados) que la 18-OH-B y 18-DAL son compuestos intermediarios en la biosíntesis de Aldo a partir de B. Por otro lado, por observación de las estructuras moleculares de dichos esteroides, Figuras 9 y 12, es químicamente observable que para que 18-OH-B y 18-DAL den lugar a Aldosterona es necesario que ocurra una oxidación. Dicho proceso podría ocurrir de 2 formas distintas, según se ha indicado en la Introducción:

- Por medio de una deshidrogenación.
- Por medio de una hidroxilación.

Los experimentos aquí descritos pretenden estudiar los requerimientos para la oxidación a Aldo a partir de 18-DAL y de 18-OH-B, para luego poder postular un mecanismo de oxidación:

a) Requerimiento de NADP^+ o NADPH : homogenatos provenientes de 100 ± 5 mg de adrenales de rata fueron incubados a $\text{pH} = 4,8$ con NADP^+ 0,5 mM ó NADPH 0,5 mM, ó malato 9 mM, ó NADP^+ 0,5 mM más cantidades crecientes de malato, desde 0,15 mM hasta 9 mM.

De esta manera se pudo estudiar el efecto, sobre la síntesis de Aldosterona a partir de 18-DAL, de NADP^+ y NADPH , y del llamado "sistema generador de NADPH " (53)

(82) (Ver Introducción).

Como precursores se usaron 0,8 μ Ci de 1,2-³H-18-OH-B ó 0,8 UCi de MAC-³H preparado como se indicó en la Sección I.

b) Requerimiento de O₂: 100 \pm 5 mg de cuartos de adrenales de rata se incubaron en tubos de Thumberg bajo las siguientes condiciones alternativas:

- 1) Atmósfera: carbógeno o N₂. Para ésto se hizo vacío en los tubos y luego se saturaron con los gases.
- 2) Precursores: 0,8 UCi de 1,2-³H-18-OH-B o de MAC-³H.
- 3) pH = 4.8 ó 7.4; ambos buffer fueron adicionados de malato 9 mM y NADP⁺ 0,5 mM.

En ambos casos, a) y b), se midió la aldosterona tritiada formada durante la incubación.

XI) LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS BIOSINTESIS DE MS Y
ALDOSTERONA A PARTIR DE 18-OH-B Y 18-DAL.

a) Experimentos previos.

Se homogeneizaron adrenales de rata en Sacarosa 0,25 M de pH 7,4 en el homogeneizador Potter-Elvehjem. El homogenato se llevó luego a la relación 150 mg de tejido adrenal/ml de medio, y se utilizó en los siguientes experimentos:

1) 18-OH-B ó 18-DAL tritiadas (1,8 μ Ci de Ae = 6,9 μ Ci/umol) se incubaron durante 20 min con distintas cantidades de homogenato. El volumen de incubación se llevó a 1 ml con Sacarosa 0,25 M de pH 7,4 y luego fue completado con medio buffer fosfato pH 7,4 de manera de obtener las concentraciones finales indicadas para el buffer TRIS de pH 7,4 0,0135 M (parte c de la Sección IV de Materiales y Métodos).

Finalizada la incubación se semicuantificó el MS radiactivo producido, graficándose este último valor en función de la masa de tejido correspondiente al volumen de homogenato agregado a cada incubación.

De dicho gráfico se sacó el máximo valor de masa de tejido que estaba sobre la zona recta, el cual correspondió a 50 mg de tejido adrenal.

2) 18-OH-B ó 18-DAL tritiadas (1,8 μ Ci de Ae = 6,9 μ Ci/Umol) se incubaron con el volumen de homogenato correspondiente a 50 mg de tejido adrenal durante distintos

tiempos. El medio de incubación fue completado como en el experimento anterior, más malato 5 mM y NADP⁺ 0,5 mM.

Finalizada la incubación se cuantificó Aldo y se semicuantificó MS, graficándose estos valores en función del tiempo de incubación. De dicho gráfico se sacó el máximo valor de tiempo de incubación que estaba sobre la zona recta, el cual correspondió a 30 minutos.

De esta forma se obtuvieron las condiciones para efectuar las incubaciones que permitiesen dilucidar en qué fracción subcelular ocurre la biosíntesis de Aldo y MS a partir de 18-OH-B y 18-DAL

b) Fraccionamiento Subcelular.

Un homogenato de adrenales de rata preparado como se indicó en el punto anterior, se sometió a fraccionamiento por centrifugación diferencial según el esquema de la Figura 24, obteniéndose las fracciones allí indicadas:

H= homogenato inicial.

N= precipitado de 600 xg.

M= precipitado de 12000 xg a partir del sobrenadante de 600 xg.

m= precipitado de 100.000 xg a partir del sobrenadante de 12000 xg.

S= sobrenadante de 100.000 xg.

Los precipitados (fracciones N, M y m) se resuspendieron en el menor volumen posible de medio (Sacarosa

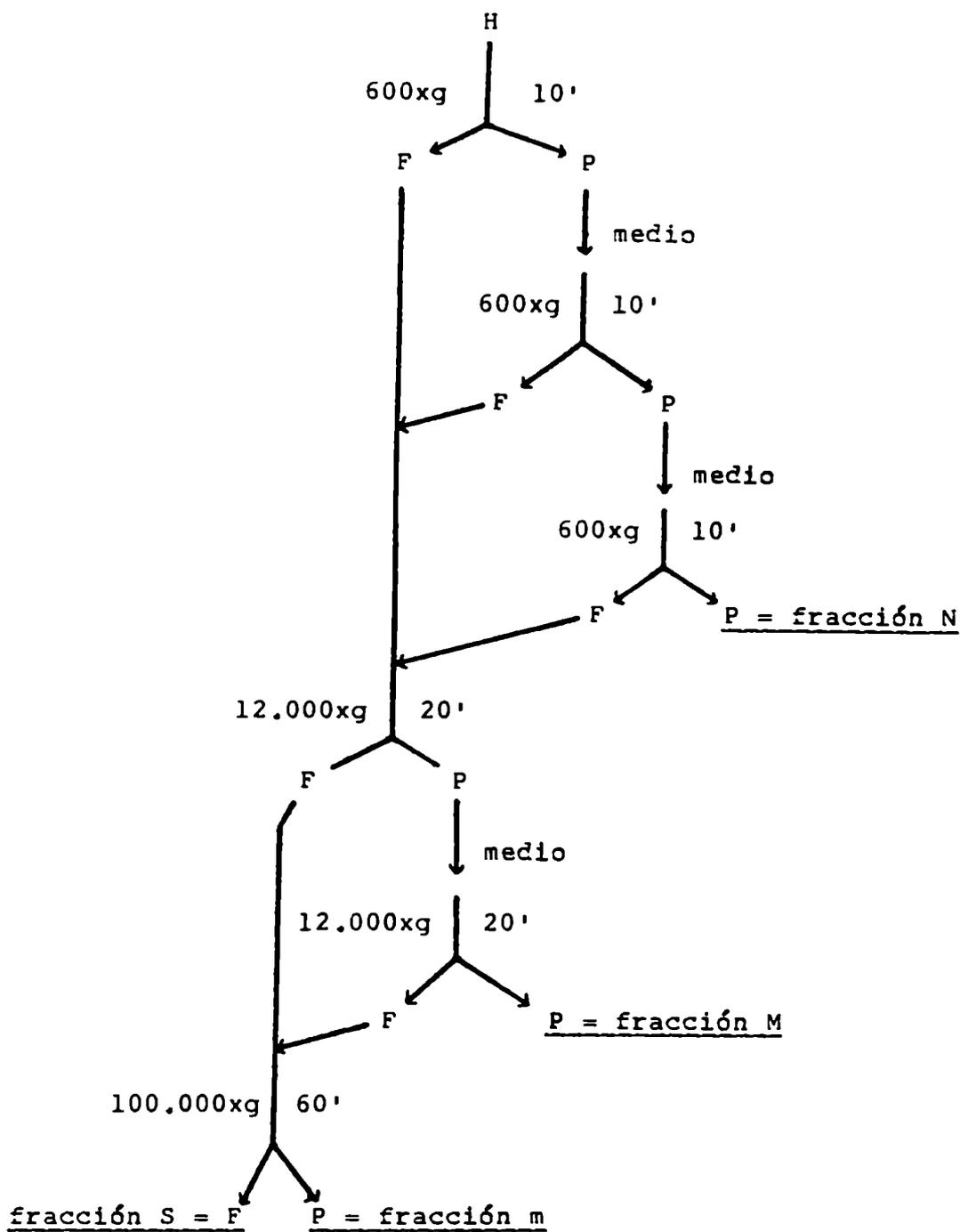


Figura 24: centrifugación diferencial para la obtención de las fracciones subcelulares. H = homogenea to inicial.

0,25 M de pH 7,4).

Sobre cada fracción se realizaron las siguientes determinaciones:

1) Actividad enzimática de Succínico deshidrogenasa:

se empleó el método descrito por Pennington(148).

Brevemente: en un volumen final de 1 ml de buffer fosfato 50 mM de pH 7,4 se incubó durante 10 minutos Succinato de Sodio 50 mM, Sacarosa 25 mM, INT (violeta de p-yodonitrotetrazolio) 0.1 % p/v, con cada una de las fracciones subcelulares obtenidas. La reacción se para por agregado de 1 ml de TCA 10%. Se agregan luego 4 ml de Acetato de etilo, se centrifuga y se lee la absorbancia de la fase orgánica a 490 nm contra un blanco preparado de la misma forma pero sin Succinato de Sodio.

Se define 1 Unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que produce una absorbancia de 0.010.

2) Proteínas:

se empleó el método de Lowry y col. (149).

3) Actividad enzimática de formación de Aldo a partir de 18-OH-B y de 18-DAL:

se empleó la medición ya descrita en las incubaciones de homogenatos de adrenales de rata (punto h de la Sección IV de Materiales y Métodos) bajo las siguientes condiciones: de cada fracción enzimática se incubó la cantidad proveniente de 50 mg de tejido adrenal, durante 30 minutos, con 1,8 μ Ci 1,2-³H-18-OH-B ó 1,2-³H-18-DAL (Ae=

6,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) a pH 7,4 (Buffer Tris) ó pH 4,8 (Buffer Acetato). En todos los casos el medio se adicionó de malato 5 mM y NADP^+ 0,5 mM.

Se define una UE como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato en Aldosterona.

4) Actividad enzimática de formación de MS a partir de 18-OH-B y de 18-DAL.

Se incubaron cantidades de cada fracción subcelular provenientes de 50 mg de tejido adrenal, durante 30 minutos con 1,8 μCi de $1,2\text{-}^3\text{H}\text{-}18\text{-OH-B}$ ó $1,2\text{-}^3\text{H}\text{-}18\text{-DAL}$ ($A_e = 6,9 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) a pH 7,4 (Buffer Tris). Luego se midió en el incubado MS de acuerdo al método descrito en la Sección IV de Materiales y Métodos.

Se define una UE como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato en producto.

XII) LOCALIZACION SUBMITOCONDRIAL DE LA BIOSINTESIS DE ALDO.

a) Experimentos previos.

Se preparó un homogenato de glándulas adrenales de rata de la forma indicada en la Sección XI de Materiales y Métodos.

Luego se realizaron los siguientes experimentos:

1) Se incubaron 1,88 μCi de 1,2- ^3H -B (Ae= 6,92 UCi/Umol) durante 10 min con cantidades crecientes de homogenato. El volumen de incubación se llevó a 5 ml con medio buffer $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ de pH 7,4 de una concentración suficiente para obtener las concentraciones finales indicadas en la parte C de la Sección IV de Materiales y Métodos para el mismo buffer 0.0135 M.

Finalizada la incubación se cuantificó la Aldo tritiada. Luego se graficó este valor en función de la masa de tejido correspondiente al volumen de homogenato agregado a cada incubación. De dicho gráfico se sacó el máximo valor de masa de tejido que estaba sobre la zona recta. Dicho valor correspondió a 30 mg.

2) El volumen de homogenato proveniente de 30 mg de tejido adrenal se incubó con 1,88 μCi de 1,2- ^3H -B (Ae = 6,92 $\mu\text{Ci}/\text{Umol}$) durante distintos tiempos. El volumen de incubación se completó a 5 ml como en el experimento anterior.

Finalizada la incubación se cuantificó la Aldo tritiada producida, graficándose este valor en función del

tiempo de incubación. De dicho gráfico se sacó el máximo valor de tiempo que estaba sobre la zona recta, el cual correspondió a 20 minutos.

De esta forma se obtuvieron las condiciones para efectuar las incubaciones posteriores.

b) Fraccionamiento Submitocondrial.

Se siguió el método de Schnaitman y col. (150) con pequeñas modificaciones.

Se homogeneizaron adrenales de rata en buffer Hepes suplementado (Hepes-S) de pH 7,4 en un homogeneizador Potter-Elvehjem en la relación 600 mg de tejido/ml de medio.

El buffer Hepes-S consistió en: Hepes (Acido N-2-hidroxiethyl piperazina-N'-2-etanosulfónico) 2 mM; manitol 220 mM; Sacarosa 70 mM y Albúmina de Suero Bovino (BSA) 0,5 mg/ml. El pH del medio se ajustó a pH 7,4 con KOH justo antes de usarlo.

El homogenato se llevó luego a la relación 250 mg de tejido /ml de medio y se sometió a fraccionamiento por centrifugación diferencial según el esquema de la Figura 24; obteniéndose las mismas fracciones subcelulares ahí indicadas: H, N, M, m y S.

Sobre cada fracción se midieron: 1) proteínas según Lowry y col. (149); 2) la actividad enzimática de Succínico deshidrogenasa (SDH) según el método de Pennington (148) ya descripto en la Sección XII de Materiales y Mé-

todos; 3) la actividad de formación de Aldo a partir de B usando las condiciones obtenidas en los experimentos previos, es decir: 1,88 μCi de $\text{B-}^3\text{H}$ ($A_e = 6,92 \text{ UCi}/\mu\text{mol}$) se incubaron con la cantidad de cada fracción proveniente de 30 mg de tejido adrenal durante 20 minutos en un volumen final de 5 ml que tenía buffer Krebs-Ringer de pH 7,4 (parte c) de Sección II de Materiales y Métodos) el cual era ahora adicionado de malato 5 mM y NADP^+ 0,5 mM. A partir de estas mediciones se concluyó que la fracción subcelular M era la enriquecida en mitocondrias y que, además, en ella ocurría, como era de esperar, la formación de Aldo a partir del precursor usado.

Luego, a partir de la fracción M, se procedió a obtener las fracciones submitocondriales de acuerdo al método de Schmitman y col. (150).

La fracción M proveniente de 58 adrenales de rata se tomó con 4 ml de buffer Hepar-S. A dicha suspensión se le agregaron 1,6 ml de una solución de digitonina (0,5%) en buffer Hepes-S. La mezcla se dejó 20 minutos a 4°C con agitación continua. Luego se agregaron 4,6 ml de buffer Hepes-S; y se centrifugó a $12.180 \cdot \text{xg} \times 20 \text{ min}$ obteniéndose dos fracciones:

T (Precipitado).

E (Sobrenadante).

La fracción E se centrifugó a $100.000 \text{ xg} \times 60 \text{ min}$ obteniéndose dos fracciones: X (Precipitado)

I (Sobrenadante).

La solución de digitonina se preparó agregando el buffer Hepes-S (pero sin la BSA) en ebullición sobre el detergente, agitando luego durante 20 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. En ese instante se agregó la BSA necesaria para obtener una concentración de 0,5 mg/ml.

Sobre cada una de las fracciones así obtenidas (T; E; X; I) se midieron las siguientes actividades enzimáticas marcadoras mitocondriales:

- 1) SDH: para membrana interna.
- 2) Monoamina oxidasa (MAO): para membrana externa.
- 3) Adenilato quinasa (Aq): para espacio Intermembrana.

La SDH se midió de acuerdo al método de Pennington ya descripto (148).

La MAO se midió de acuerdo al método de Johnston (151): 60 nmoles de Serotonina-¹⁴C (Ae= 56,3 mCi/mmol) se incubaron 30 min a 37°C con la cantidad de cada fracción proveniente de 30 mg de tejido adrenal, en buffer fosfato 10 mM de pH 8,2. El volumen final de incubación fue de 0,4 ml. La reacción se paró con 0,2 ml de HCl 2 N. Luego se extrajo el incubado 2 veces con 2 ml de Acetato de etilo cada vez. El extracto orgánico se lavó con 0,2ml de HCl 0,3 N, y en él se midió la radiactividad. Simultáneamente se preparó un blanco de reacción el cual no contenía la fracción enzimática.

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1000 dpm de Serotonina-¹⁴C.

La Aq se midió según el método descrito por Schmaitman y Greenawalt (152), el cual consiste en seguir espectrofotométricamente la conversión de ADP a ATP + AMP, acoplado la formación de ATP a la reducción de NADP⁺ con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla de ensayo contuvo: 0,75 M NADP, 15 mM glucosa, 10 UI de hexoquinasa, 0,4 UI de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 0,45 mM KCN y 5 mM Cl₂Mg, en buffer glicil-glicina 70 mM de pH 8. Esta mezcla se preincubó 5 min a temperatura ambiente y luego se agregó la fuente de enzima, llevándose el volumen final a 2 ml con buffer. Inmediatamente se comenzó a medir el aumento en el tiempo de la Absorbancia a 340 nm, contra un blanco al que sólo le faltaba el ADP.

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce una velocidad de aumento de la Absorbancia de 0.001 va/segundo.

Paralelamente se midió también la actividad enzimática de formación de Aldo a partir de B usando las condiciones obtenidas en los experimentos previos en cada una de las fracciones T, E, X, I así también como en las mezclas:

T + E; T + X; T + I; T + E + I

El medio buffer usado en estas determinaciones fue el Krebs Ringer adicionado de: malato 5 mM y NADP⁺ 0,5 mM, o de NADPH 0,5 mM.

Las determinaciones se realizaron por duplicado o triplicado, según se indica en Resultados.

XIII) EXPERIMENTOS CON ACTH.

Con el fin de estudiar los efectos del ACTH sobre la producción de Aldosterona, se efectuaron los siguientes experimentos:

a) A partir de 18-OH-B.

0,8 μ Ci de 1,2-³H-18-OH-B se incubaron con 100 \pm 5 mg de cuartos de adrenales de rata, a 37°C, en 2 ml de buffer de pH = 7,4 ó 4,8, durante 90 minutos en ausencia o presencia de 1 UI ó 10⁻⁴ UI de ACTH (ELEA).

Los experimentos se realizaron por triplicado.

Finalizada la incubación, el sobrenadante y las glándulas se trataron como se indica en la Sección IV. Luego se cuantificó Aldosterona y se semicuantificó 18-OH-B; 18-DAL; y MS (material saponificable). También a partir de 18-OH-B se realizaron incubaciones con las mismas concentraciones de ACTH, a los mismos pHs, pero variando el tiempo de incubación desde 30 minutos hasta 150 minutos (Curva de tiempo).

b) A partir de 18-DAL.

0,8 μ Ci de 18-DAL tritiada se incubaron en las mismas condiciones que las recién descritas para 18-OH-B. Finalizada la incubación se determinó, también igual que antes, 18-OH-B, 18-DAL, Aldosterona y MS.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

XIV) DROGAS Y SOLVENTES.

<u>Sustancia</u>	<u>Procedencia y características.</u>
1,2- ³ H-18-OH-B	The Radiochemical Center, Amersham, 52 Ci/mmol.
4- ¹⁴ C-Aldosterona	New England Nuclear, 57 Ci/mmol.
1,2- ³ H-Corticosterona	New England Nuclear, 40 Ci/mmol.
¹⁴ C-Serotonina	Dupont, NEN, 56,3 $\frac{\text{mCi}}{\text{mmol}}$
18-OH-B	Makor Chemicals.
18,21-Diacetato de Aldosterona.	Sigma Chemicals.
Benceno.	Berna, puro, destilado antes de su uso.
Metanol	Eclair, puro, destilado an- tes de su uso.
Cloruro de metileno.	Eclair, puro, destilado an- tes de su uso.
Acetato de etilo.	Eclair, puro, destilado an- tes de su uso.
Hexano.	Carlo Erba, grado RPE.
Acetona.	Carlo Erba, grado RPE, desti- lada antes de su uso.
Ciclohexano.	Mallinckrodt, reactivo ana- lítico.
Dioxano.	Carlo Erba, grado RP.
Eter etílico.	Sintorgan, purificado con SO ₄ Fe/SO ₄ H ₂ , destilado antes de su uso.
Heptano.	Sintorgan, para análisis
Tolueno.	Sintorgan, puro, destilado antes de su uso.

Piridina.	Sintorgan, para análisis, <u>des</u> tilada antes de su uso.
Anhídrido Acético.	Mallinckrodt, reactivo ana- lítico.
Acido acético glacial.	Merck, para análisis.
Propilenglicol.	Mallinckrodt, para análisis.
Acido Sulfúrico.	Merck, para análisis.
Acido Clorhídrico.	Merck, para análisis.
Acido Fosfórico.	Merck, para análisis.
Acido Tricloroacético.	Sigma Chemicals.
Amoníaco.	Carlo Erba, grado RPE.
Bicarbonato de Sodio.	Mallinckrodt, reactivo ana- lítico.
Bicarbonato de Potasio.	Mallinckrodt, reactivo anal.
Cloruro de Sodio.	Merck, para análisis.
Cloruro de Potasio.	Merck, para análisis.
Cloruro de Calcio.	Merck, para análisis.
Fosfato diácido de Sodio.	Mallinckrodt, reactivo ana- lítico.
Sulfato de Sodio.	Carlo Erba, grado RPE.
Sulfato de Magnesio.	Riedel de Haen Ag., para ana- lisis.
Oxido crómico.	Merck, para análisis.
Succinato de Sodio.	Sigma Chemicals.
Malato ácido de Sodio.	Sigma Chemicals, 95-100%.
Hepes.	Sigma Chemicals.
Tris.	Sigma chemicals.
Glucosa.	Drocefa.

Sacarosa.	Carlo Erba, grado RPE.
Manitol.	RIVERO, Solución estéril.
PPO.	Packard, grado centelleo.
Dimetil -POPOP.	Sigma Chemicals.
BSTFA.	Sigma Chemicals.
ADP.	Sigma Chemicals, 95%.
NADH.	Sigma Chemicals, 98%.
NADP.	Sigma Chemicals, 98%.
NADPH.	Sigma Chemicals, 98%.
INT.	Sigma Chemicals.
BSA.	Sigma Chemicals.
Hexokinasa.	Sigma Chemicals.
Glucosa-6-fosfato- deshidrogenasa.	Sigma Chemicals.
ACTH.	ELEA.

R E S U L T A D O S

R E S U L T A D O S

I) FORMAS MENOS POLARES DE LA 18-HIDROXICORTICOSTERONA.

a) Fue necesario repetir algunos experimentos de Aragonés y otros (6) con el doble fin de obtener las formas menos polares de 18-OH-B para estudiar estructuras posteriores y de aclarar la composición de algunas fracciones no resueltas con anterioridad (entendiéndose por composición el número y características de especies químicas aislables).

En las Tablas 3 y 4 se muestran los R_f, los T_R y los porcentajes de cada una de las formas menos polares de 18-OH-B obtenidas por suspensión del esteroide en medio HCl 10⁻² N y posterior análisis de la suspensión por CP y CLAP, según las condiciones detalladas en la leyenda. Los R_f en CP coinciden con los previamente informados por Aragonés y col. (6). Como puede verse el reactivo 18-OH-B se consume en un 90% y el producto de reacción mayoritario es la forma menos polar de la 18-OH-B, en CP, de R_M = 4.33. El porcentaje de esta forma menos polar es del 82,4%, muy cercano al obtenido por Aragonés y col. (6).

Las 4 formas menos polares reaccionaron en distinta forma y medida bajo las 4 condiciones tratadas:

- a) Residuo seco durante 1 día.
- b) Residuo seco durante 7 días.
- c) NH₃ durante 1 día.
- d) NH₃ durante 7 días.

T A B L A 3.

		18-OH-B	Formas menos Polares de 18-OH-B		
Análisis Cualitativo	Rf	0,12	0,63	0,75	0,93
	RM	1	5,26	6,33	7,75*
Análisis Cuantitativo	%	9,4	4,3	2,3	1,6
			82,4		

* Según Aragonés y col. (6) este compuesto es de RM 7.18. Debe tenerse en cuenta que si el Rf fuese 0,92 en vez de 0,93 se obtendría dicho valor. Por esta razón, en el texto se asume siempre el valor de RM = 7.18.

Rfs y porcentajes de las formas menos polares de la 18-OH-B obtenidas al suspender la forma M de dicho esteroide en HCl, en la cromatografía en papel usando el sistema Hush B₅ (73) como fase móvil. Las muestras se analizaron según lo indicado en Materiales y Métodos.

T A B L A 4

		Condiciones de CLAP	18-OH-B	Formas menos polares de 18-OH-B			
Análisis Cualitativo: Tiempos de Retención (T _R) en minutos.	Elución	Fase Móvil	R _M 1	R _M	R _M	R _M	R _M
	Isocrática	Metanol:Agua (70:30)	4,15	4,60	4,80	7,20	9,55
		Acetonitrilo: Agua.(85:15)	3,15	3,40	3,70	4,85	6,05
	Por Gradiente Lineal	Metanol:Agua según %M=100- $\frac{5}{\text{min}}$ t	3,10	3,75	4,60	7,15	10,10
	Por Gradiente Exponencial	Acetonitrilo: Agua Según $\frac{-0,06t}{\text{min}}$ %A=100e	2,95	3,95	5,25	7,85	11,20
Análisis Cuantitativo (%)	Isocrática	Metanol: agua (70:30)	10,9	81,0	4,5	2,5	1,1

Análisis cualitativo (T_R) y cuantitativo (%) de la forma M de 18-OH-B y de sus formas menos polares obtenidas por suspensión de aquélla en HCl, por CLAP bajo distintas condiciones. Los R_M corresponden a la identificación por cromatografía en papel en el sistema Bush B₅ (Ver Tabla 3). % M y % A equivalente a % de Metanol y % de Acetonitrilo respectivamente, en la fase móvil; t = tiempo de corrida. Para detalles metodológicos ver el texto. El análisis de las muestras previamente llevadas a residuo seco dió resultados indistinguibles de éstos.

En efecto, mientras que la forma menos polar de $R_f = 0,75$ (R_M 6.33) en residuo seco y en medio amoniacal produjo un material radiactivo de $R_f = 0,35$ las restantes formas menos polares (R_f s 0,52; 0,63 y 0,93) revirtieron a 18-OH-B en las mismas condiciones. Por otro lado, en todos los casos, al aumentar el tiempo de reacción aumentó también la cantidad de producto formado por reversión.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos. En ella se puede ver que el tratamiento con NH_3 fue siempre más eficiente que el residuo seco. El caso más significativo fue el del material de R_f 0.52 que no varió en residuo seco pero que revirtió en un 79 % cuando se lo trató con NH_3 .

b) Los estudios estructurales.

La suspensión de 18-OH-B en HCl 10^{-2} N produce una mezcla de 5 fracciones radiactivas entre las que predomina la de R_M 4.33 (80%) (Tabla 3). Cuando el medio es acidificado por burbujeo de Cloruro de hidrógeno, el 98% de la mezcla es transformado en dicha forma menos polar.

La estructura del R_M 4.33 fue determinada por RMN de ^{13}C y de 1H , y su identidad con 18-DAL fue confirmada por comparación con este compuesto obtenido por hidrólisis ácida del 21-Acetato de 18-DAL. Los datos de RMN de los compuestos estudiados están descritos en las Tablas 6 y 7.

T A B L A 5

Forma menos polar de 18-OH-B (inicial)	Rfs y (%) de los Productos obtenidos luego del tratamiento de cada forma menos polar de 18-OH-B en:			
	RS 1 día	RS 7 días	NH ₃ 1 día	NH ₃ 7 días
Rf 0,52 (R _M 4,33)	0,52 (100)	0,52 (100)	0,52 (28) 0,12 (72)	0,52 (21) 0,12 (79)
Rf 0,63 (R _M 5,26)	0,63 (98)	0,63 (89)	0,63 (61) 0,12 (39)	0,63 (45) 0,12 (55)
Rf 0,75 (R _M 6,33)	0,75 (99)	0,75 (98)	0,75 (79) 0,35 (21)	0,75 (50) 0,35 (50)
Rf 0,93 (R _M 7,18)	0,93 (27)	0,93 (15)	0,12 (100)	0,12 (100)

Análisis Cualitativo (Rf) y Cuantitativo (%) de los productos obtenidos al tratar cada una de las formas menos polares de 18-OH-B en Residuo seco (RS) y en solución 0,013 N de NH₃ (NH₃). El Rf 0,12 corresponde a la forma M de la 18-OH-B. El producto de Rf 0,35 no pudo asignarse a ningún compuesto descripto, sabiéndose solamente que no corresponde a Aldosterona (Rf 0,31). El sistema cromatográfico usado fue cromatografía en papel en el sistema Bush B₅ (73).

T A B L A 6

Datos espectrales de ^{13}C -RMN.

a. ^{13}C -RMN a 25.2 MH_z .

b. ^{13}C -RMN a 75 MH_z .

c. Pequeñas diferencias observadas con respecto al espectro de 18-DAL deben ser adjudicadas a la presencia de HCl disuelto.

Los valores entre paréntesis o corchetes pueden ser intercambiados.

T A B L A 6

Carbono	18-DAL ^a - 21-Acetato	18-DAL ^a	18-HO-B ^b	18-HO-B + HCl ^b
1	36.73	36.74	35.47	36.81
2	36.00	36.01	32.13	36.08
3	198.92	199.05	199.20	201.09 ^c
4	124.14	124.18	122.59	124.38
5	169.85	169.83	171.80	170.20 ^c
6	33.61	33.62	33.83	33.64
7	32.76	32.75	32.94	32.84
8	31.37	31.35	32.01	31.45
9	50.59	50.49	(55.04)	50.60
10	38.56	38.57	35.17	38.68
11	74.42	74.51	65.77	74.63
12	42.73	42.87	46.48	42.98
13	53.77	53.89	52.48	54.60
14	54.32	54.28	(56.36)	54.40
15	(25.51)	(25.58)	[25.25]	25.63
16	(25.98)	(26.05)	[26.01]	26.10
17	58.23	58.24	56.75	58.38
18	68.91	69.04	73.41	69.12
19	18.63	18.65	21.36	18.73
20	203.25	209.51	105.95	210.00 ^c
21	68.91	69.49	68.60	69.58
CH ₃ CO-	20.36	---	---	---
CH ₃ CO-	169.85	---	---	---

T A B L A 7

	18-OH-B	18-OH-B + HCl
H-4	5,70 (bs)	5,76 (bs)
H-11	4,43 (bt, J= 3 Hz)	4,43 (bd, J= 6 Hz)
H _A -18	4,27 (d, J= 10 Hz)	3,73 (d, J= 9 Hz)
H _B -18	3,80 (d, J= 10 Hz)	3,36 (d, J= 9 Hz)
H _A -21	3,82 (dd, J= 10 Hz, J= 12 Hz)	4,23 (s)
H _B -21	3,65 (dd, J= 10 Hz, J= 12 Hz)	
20-OH	3,32 (s)	
21-OH		3,02 (bs)
CH ₃ -19	1,41 (s)	1,28 (s)

Datos de ¹H-RMN a 300 MHz.

bs: señal ancha; bt: triplete ancho;

d: doblete; dd: doble doblete; s: singulete;

bd: doblete ancho.

Los valores están referidos a TMS. Solvente: CDCl₃.

El R_M 4.33 fue preparado "in situ" por burbujeo de vapores de cloruro de hidrógeno por unos pocos segundos, a través de la solución de 18-OH-B en deuterocloroformo; la solución resultante se utilizó directamente para el análisis por RMN. Al reemplazar los vapores de HCl por los de DCl, la conversión al R_M 4.33 fue mucho menor. La presencia de líneas de resonancia de baja intensidad a parte de aquéllas listadas en la Tabla 7 indicó en la suspensión de 18-OH-B en HCl la presencia de uno o más compuestos menores que acompañan al principal componente R_M 4.33. Luego de finalizados los análisis por RMN la solución en deuterocloroformo se llevó a sequedad, bajo vacío, y el material sólido obtenido se cromatografió en papel en el sistema Bush B₅. Otra parte del material se cromatografió por CLAP con Metanol: Agua (70 : 30) como fase móvil isocrática o con gradiente de elución lineal y exponencial de Acetonitrilo-Agua.

Paralelamente a ambas cromatografías se procesó una suspensión (solución ?) de 18-OH-B tritiada en HCl. Los cromatogramas obtenidos revelaron en todos los casos identidad entre el material analizado por RMN y las formas menos polares de 18-OH-B.

Se concluye así que al tratar 18-OH-B con HCl se obtiene 80% de R_M 4.33 y que esta fracción radiactiva es idéntica a 18-Desoxialdosterona. Por otro lado 18-DAL radioinerte se cromatografió paralelamente a los materiales radiactivos anteriores, evidenciándose nuevamente

coincidencia entre las fracciones radiactivas y la radio-
inerte revelada por UV.

II) FORMA MENOS POLAR DE LA ALDOSTERONA.

a) Producción e Irreversibilidad.

Al estudiar las transformaciones a Aldo en medio ácido hay que preguntarse si, a semejanza de lo que ocurre con la 18-OH-B, el mineralocorticoide no podría, él también, convertirse parcialmente a formas menos polares. En caso afirmativo los rendimientos de Aldo tendrían que expresarse entonces como suma de Aldo comunmente aislada más sus formas menos polares producidas en medio ácido.

Al suspender Aldosterona en medio HCl 10^{-2} N se pudo aislar un compuesto de muy baja polaridad (Rf 0,92) en el sistema Bush B₅ (73).

En la TABLA 8 figuran las características cromatográficas de la FMPA en distintos sistemas: sobre papel con distintas fases móviles; sobre placas delgadas de alta resolución (HPTLC) de fase reversa (RP-18) y de sílica gel; y por CLAP en fase reversa. El tratamiento de esta FMPA con Anhídrido Acético + Piridina (1 : 1) durante 20 hs a 28°C, dió lugar a un compuesto que, analizado por CP en el sistema Cy Di I (128), resultó cromatografiar con el frente (Tabla 8).

Como se verá más adelante (Ver también Materiales y Métodos) la FMPA pudo ser también aislada a partir de los incubados de adrenales de rata con $1,2\text{-}^3\text{H-18-OH-B}$.

T A B L A 8

Compuesto	Rf en cromatografía en papel		Rf en TLC de Sílica gel		Rf en RP-18 HPTLC		Volumen de Retención en CLAP analítica
	Bush B ₅	CYD1 I	Bush A	Hexano- acetona (5:4)	Benceno- Acetato de etilo (2:1)	Metanol- Agua (7:3)	
Aldo	0.31	0.22	0	0.39			4.6 ml
FMPA	0.93	0.78	0.13	0.60	0.40	0.31	16.2 ml
MS	0.93			0.71			22.3 ml
R _M 7.18*	0.93			0.63			18.4 ml
FMPA acetilada					1.00		

Comportamiento cromatográfico de Aldo, su forma menos polar (FMPA), y demás compuestos que co-cromatografían en el Bush B₅ (Ver el texto).

* R_M 7.18 = forma menos polar de 18-OH-B.

La identidad entre el compuesto aislado de las incubaciones y el otro preparado como se indicó más arriba, se estableció por sus propiedades cromatográficas en los mismos sistemas y por recristalización hasta actividad específica constante en éter etílico-heptano (Tabla 9).

La forma menos polar de la Aldosterona resultó irreversible por mantenimiento en residuo seco y por tratamiento con NH_3 0.013 N, a los dos tiempos utilizados 1 y 7 días (o sea en condiciones en que las formas reversibles de 18-OH-B demuestran su propiedad de tales).

b) Producción de la forma menos polar de la Aldosterona a partir de distintas cantidades del esteroide.

Al disolver distintas cantidades iniciales de Aldosterona- ^{14}C en HCl 10^{-2} N se obtuvieron distintos porcentajes de la FMPA. Esto indicó que no se estaba en presencia de una reacción entre un único reactivo y un único producto en la relación 1 a 1, ya que en este caso, según la ley de acción de masas, el porcentaje de producto debe ser constante, o sea, independiente de la concentración inicial de reactivo. En efecto, si la reacción fuese:



sería

$$K_{eq} = \frac{(\text{FMPA})}{(\text{Aldo})}$$

Nota: no se consideran (H_2O) y (H_3O^+) ya que sus concentraciones son infinitamente mayores que las de los esteroides.

Llamando "c" a la concentración inicial de Aldo y

T A B L A 9

Pasos de Recristalización	Actividad específica (dpm/ug)
Primero	206,3
Segundo	179,5
Tercero	161,6
Cuarto	166,5

Actividades específica obtenidas luego de las sucesivas recristalizaciones en éter etílico-heptano, de la mezcla de la FMPA radioinerte preparada con Aldo y HCl y el material radiactivo de Rf 0,93 inalterable con NH_3 y KHCO_3 , aislado de las incubaciones.

"x" a la concentración de la FMPA en el equilibrio, sería:

$$\% \text{ FMPA} = \frac{x}{c} = \frac{keq}{Keq + 1} = \text{constante.}$$

Al graficar "(Aldo remanente) vs (FMPA producida)" no se obtuvo una línea recta.

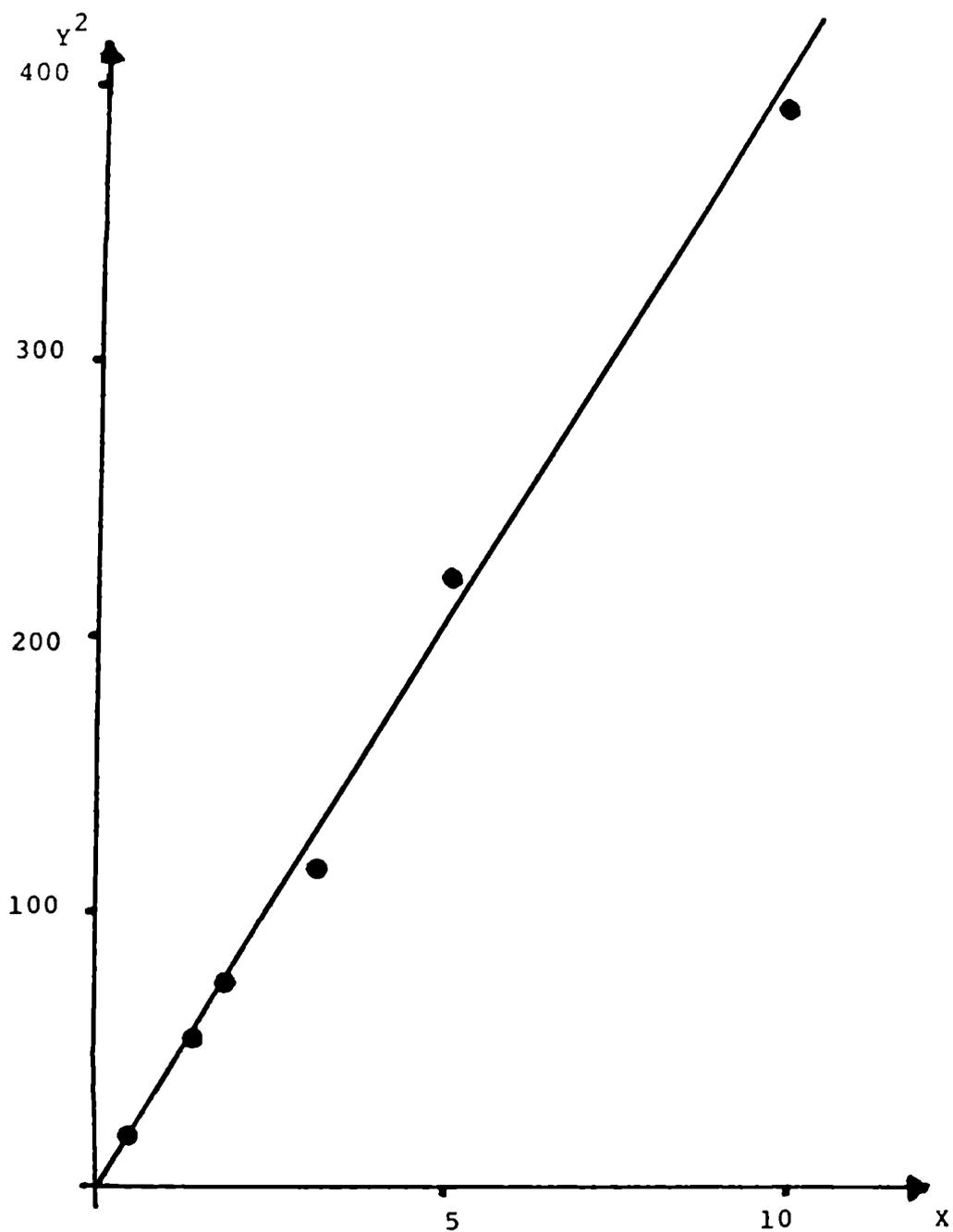
En cambio al graficar "(Aldo remanente)² vs (FMPA producida)" (Figura 25) se obtuvo una línea recta.

Este resultado indicaría que la reacción ocurre entre 2 moléculas de Aldo para dar una molécula de su forma menos polar, o sea, que esta última sería un dímero de la Aldo. De todas maneras esta observación necesitaba una confirmación por otros métodos analíticas de mayor precisión que posibilitarían: 1) o bien la determinación de las relaciones entre Aldosterona y su forma menos polar en la posición de equilibrio sin afectar a éste (inconveniente inherente a la cuantificación posterior a la separación cromatográfica); 2) o bien la determinación de la estructura de la forma menos polar de Aldosterona.

c) Determinación de la estructura de la forma menos polar de la Aldosterona.

C₁) RMN:

Para la determinación de la estructura de la forma menos polar de la Aldosterona se disolvió Aldosterona radioinerte en hexadeuterometilsulfóxido burbujeándose luego vapores de cloruro de hidrógeno a través de la so-



X= FMPA producida en nmoles. Y= Aldo remanente en nmoles

Figura 25: Gráfico Y^2 vs X para la producción de la FMPA al suspender Aldo- ^{14}C en $\text{HCl } 10^{-2}\text{N}$. FMPA y Aldo fueron separados por cromatografía en papel en el sistema Bush B₅ (73). Para más detalles ver el texto

lución. El análisis directo por RMN de ^{13}C indicó una rápida interconversión entre algunas formas, que presentaban señales muy anchas para los carbonos 9, 11, 14, 15, 16, 18, 20 y 21, y señales simples para los carbonos 4, 5, 7, 8 y 17. La forma menos polar de la Aldosterona se aisló por dilución con H_2O y posterior extracción con cloruro de metileno, seguida de purificación por CLAP preparativa de fase reversa (Ver Sección III de Materiales y Métodos). El material obtenido se analizó por RMN de ^{13}C , en el mismo solvente anterior.

Sobre los datos obtenidos en los análisis por RMN, se propuso una estructura dimérica para la forma menos polar de Aldosterona (Compuesto I en la Figura 26) en base a las siguientes evidencias espectroscópicas:

Los espectros de RMN de ^{13}C de Aldosterona en Cl_3CD y en $\text{DMSO } d_6$ (Tabla 10) son indicativos de la presencia de 2 formas isoméricas II y III (Figura 26), probablemente en equilibrio, como fue propuesto por Genard (20). Por otro lado De Vries y De Youg han informado la separación de las formas II y III por CLAP y la conversión parcial, posiblemente reversible, de II en III, en presencia de $\text{NaOH } 0.067 \text{ N}$ en etanol al 85% (77).

Nuestros resultados indican que la Aldosterona usada en nuestros experimentos debe ser una mezcla de estas dos formas isoméricas en la proporción 1 a 1. Los datos de RMN de ^{13}C para la forma menos polar de la Aldosterona (Tabla 11) son similares a las de la forma III, aunque pre

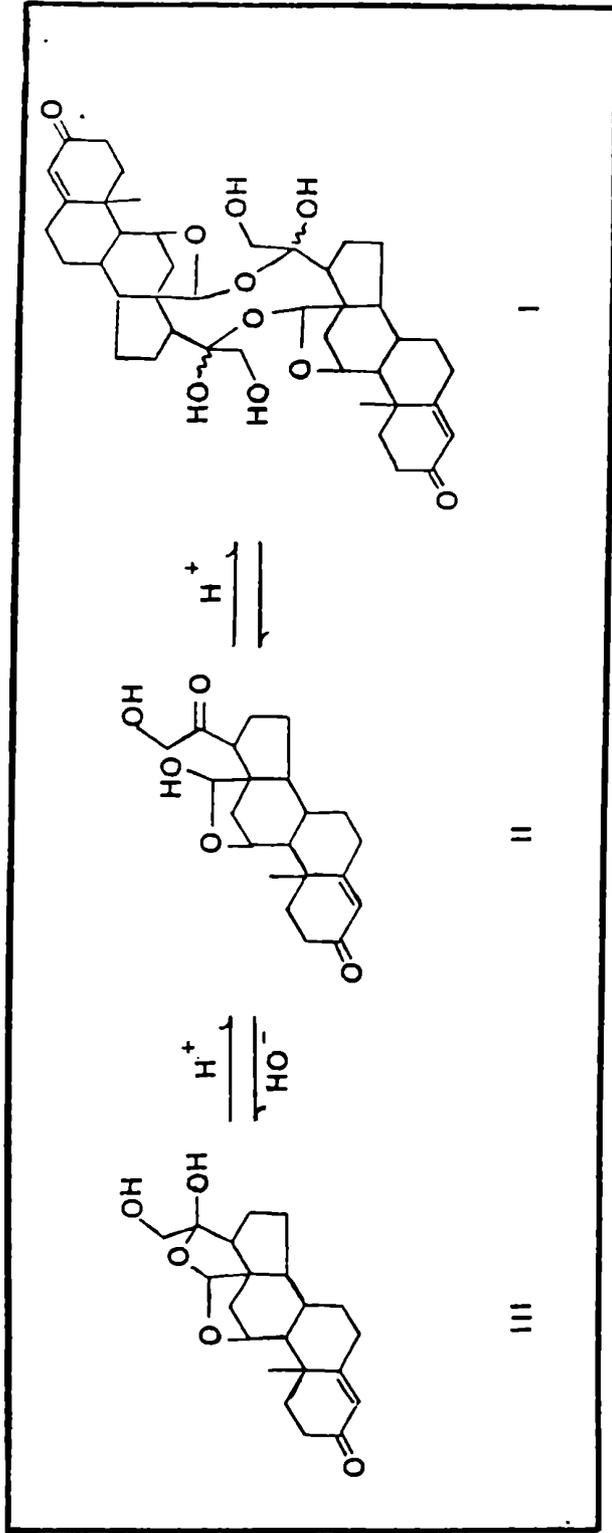


Figura 26: Interconversión entre las formas isoméricas de Aldosterona y la FMPA (I).

T A B L A 1 0.

Carbono	^{13}C -RMN a 25.2 NH_2	
	Aldo II	Aldo III
1	36.26	36.26
2	35.12	35.12
3	197.80	197.80
4	123.26	123.17
5	170.32	170.12
6	33.18	33.18
7	31.56	29.22
8	30.75	31.96
9	50.82	45.65
10	37.97	37.29
11	73.33	80.29
12	39.70	38.41
13	57.46	63.41
14	51.95	48.11
15	22.90	22.90
16	24.42	25.46
17	56.05	55.97
18	95.21	106.74
19	18.15	18.04
20	208.24	105.71
21	67.82	66.43

Espectro de RMN- ^{13}C de Aldosterona en DMSO. Los corrimientos químicos están referidos a TMS.

T A B L A 11

Carbono	FMPA (Aldo I)
1	(39.00)
2	36.10
3	198.81
4	124.24
5	169.38
6	33.71
7	32.93
8	32.03
9	(48.69)
10	(38.49)
11	81.26
12	40.33
13	64.11
14	(50.44)
15	29.58
16	25.91
17	57.20
18	(106.18)
19	18.47
20	(105.64)
21	66.89

Espectro de RMN- ^{13}C a 25.2 MH_z de la FMPA (forma I de Aldo en la Figura 26). Solvente: CDCl_3 . Los corrimientos químicos están referidos a TMS. Los valores entre paréntesis pueden intercambiarse.

sentan diferencias significativas para los carbonos 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15 y 17. Así el Carbono 18 (C-18) es acetálico y el C-20 es hemicetálico como en III (Figura 26). Por otro lado el espectro de RMN de ^1H de la forma menos polar de Aldosterona (Tabla 12) presenta un cuarteto AB para el grupo 21-hidroximetileno, el cuál sólo es consistente con un C-20 hemicetálico. El ancho singulete a 5,21 ppm y el ancho doblete a 4,81 ppm corresponden a los hidrógenos de las posiciones 18 y 11 (H-18 y H-11) respectivamente. Considerando la simetría de las 2 moléculas de Aldosterona en el dímero (Compuesto I, Figura 26) puede asumirse que los carbonos y protones simétricos son equivalentes dando resonancias a la misma frecuencia.

c₂) EM:

El espectro de masa de la forma menos polar de la Aldosterona sin derivatizar no mostró el ión molecular. El ión más pesado que se observó fue el correspondiente a $\frac{m}{z}$ 284. Este ión puede ser adjudicado a la ruptura a través de las uniones C-18-O y C-17-C-20 ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2$). También se observó un ión correspondiente a $\frac{m}{z}$ 256 ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$ proveniente de 284-CO).

El espectro de masa obtenido para la forma menos polar de la Aldosterona luego de ser sililada con BSTFA (77) está representado en la Figura 27. Aunque el ión molecular no se observa tampoco en este caso, los fragmentos a m/e 756/757 y 511/513 confirman la estructura dimé

T A B L A 12

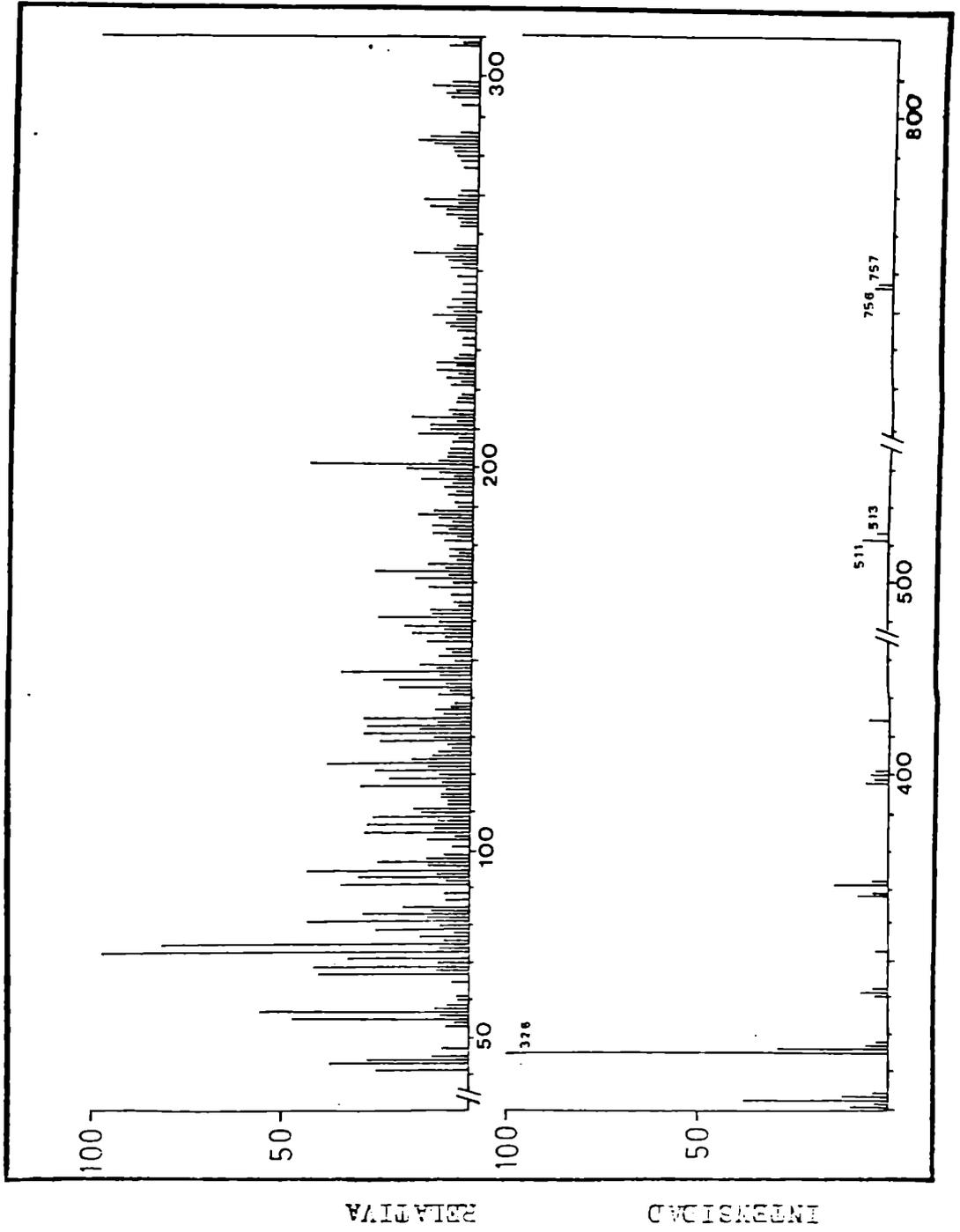
Carbono	FMPA (Aldo I)
4	5.72 (bs)
11	4.81 (bd) J = 6 Hz
18	5.21 (bs)
19	1.29 (s)
21	3.49 (d); 3.98 (d) J = 13 Hz

Espectro de ^1H -RMN a 100 MHz de la FMPA (forma I de Aldo en la Figura 26). Solvente: CDCl_3 . Los corrimientos químicos están referidos a TMS.

bs= señal ancha; bd= doblete ancho;

s= singulete; d= doblete.

Figura 27: Espectro de masa de la FMPA sillada.



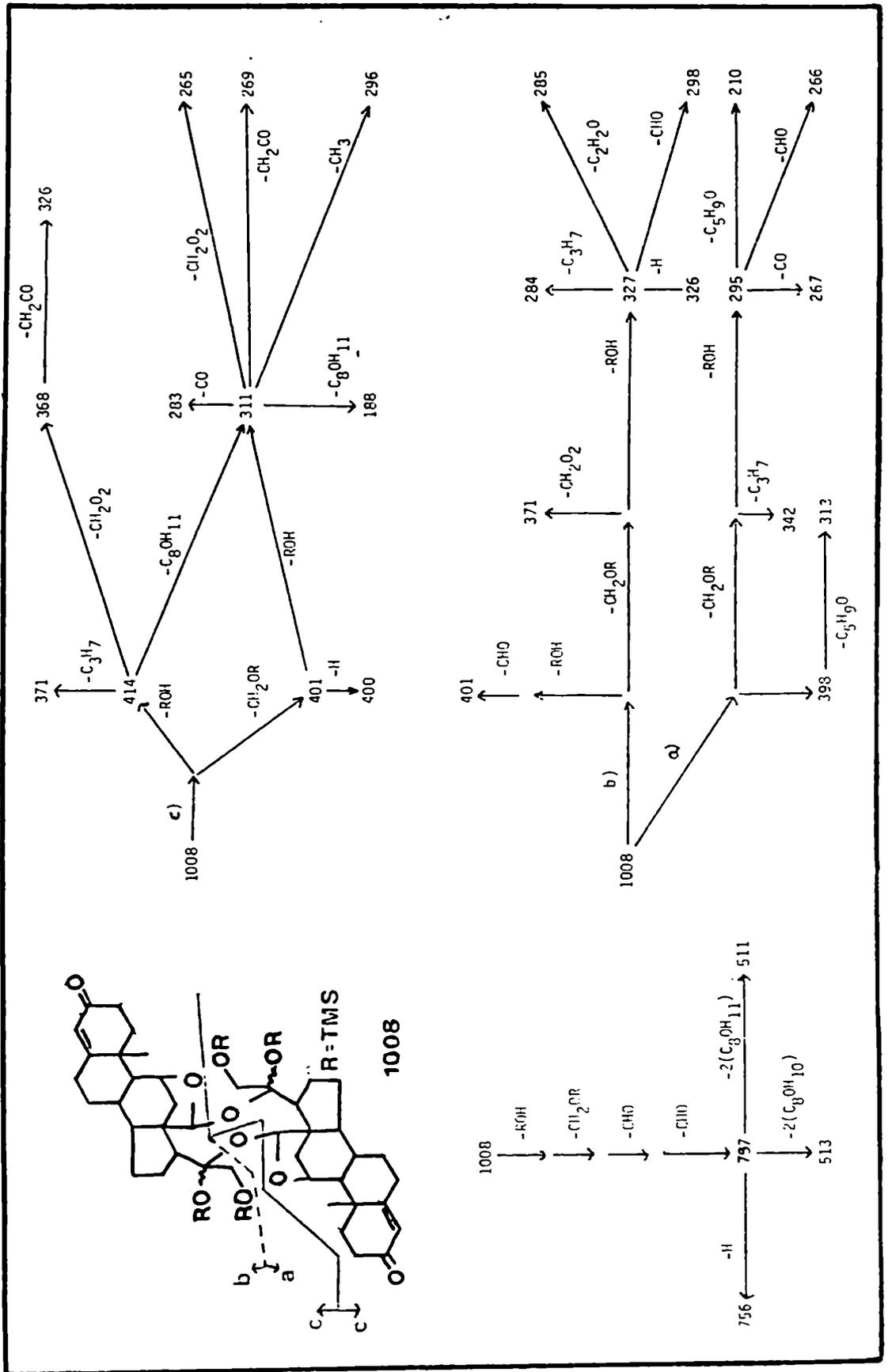


Figura 28: Esquema de fragmentación propuesto para el trimetilsilil éter de la FMPA.

rica del compuesto. El origen propuesto para estos iones, junto con el de otros fragmentos relevantes observados, se indica en la Figura 28.

El hecho que el medio ácido catalice la formación del dímero (I) puede ser explicado considerando que:

1º) Si III es formado a partir de II en condiciones básicas (77), aquél debe ser revertido por ácido.

2º) Dos moléculas de II deben experimentar una reacción catalizada por ácido para dar I (Figura 26).

La baja polaridad de la estructura dimérica I, puede ser explicada considerando que sus 4 oxhidrilos están "tapados" o "escondidos" dentro de la estructura lipofílica formada por los núcleos esteroideos.

III) CAPACIDAD PRECURSORA PARA ALDOSTERONA DE 18-OH-B
(FORMA M) Y DE MAC.

Se estudió la capacidad precursora para Aldo de la forma M de 18-OH-B y de su suspensión en medio HCl 10^{-2} N (MAC), bajo diferentes variables (Ver Materiales y Métodos, Secciones V-A y V-B). MAC, como ya fue indicado es una mezcla de cuatro fracciones, el 80% de la cual corresponde a 18-Desoxialdosterona (Tabla 3).

En estos experimentos la Aldosterona tritiada producida es expresada como la suma de la forma usualmente aislada más su dímero menos polar formado espontánea y reversiblemente luego de mantener al esteroide en medio ácido, o como un metabolito de la Aldosterona, en las incubaciones.

El análisis del incubado por cromatografía en papel en el sistema Bush B₅ permite revelar seis zonas radiactivas a partir de las cuales se cuantifican o semicuantifican distintos compuestos y fracciones (Figura 29).

En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de Aldosterona producida bajo las distintas condiciones de incubación, excepto las correspondientes a los experimentos con Preincubación de las glándulas.

Una observación de la Tabla 13 excluye al pH 7,4 como un pH conveniente para la formación de Aldo. A este pH, las cantidades de Aldo son en casi todos los casos más bajas que aquellas correspondientes a pHs menores (4,8

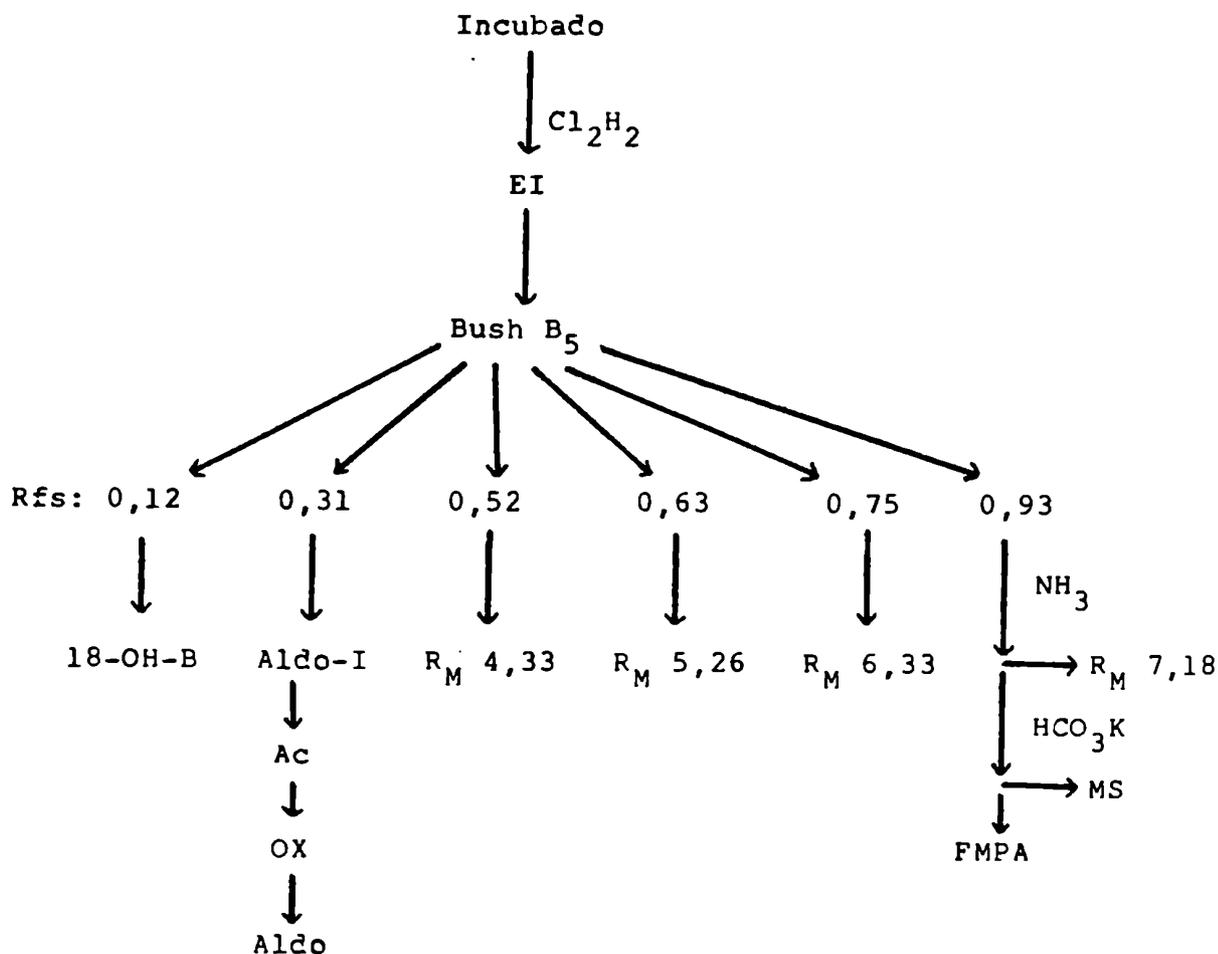


Figura 29: Esquema del análisis de los incubados por CP en el sistema Bush B₅ (73). EI= extracto inicial del incubado en Cl₂CH₂; Aldo-I= Aldo impura; Ac= Acetilación; Ox= Oxidación; R_M 4,33; R_M 5,26; R_M 6,33 y R_M 7,18= formas menos polares de 18-OH-B; MS= material saponificable; FMPA= forma menos polar de Aldosterona.

T A B L A 13.

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	TIEMPO (horas)	pH			LINEAS HORIZONTALES	
				3.3	4.8	7.4		
E R R E	A B I O T I C A	M	1	6.93 ± 2.21	6.64 ± 0.76	0.67 ± 0.02	A	
			2	9.45 ± 2.37	7.12 ± 0.33	0.73 ± 0.01	B	
	M A C		1	4.92 ± 1.43	8.66 ± 0.71	4.26 ± 0.02	C	
			2	5.88 ± 1.52	<u>9.66 ± 0.53</u>	5.57 ± 0.06	D	
	L I B	A B I O T I C A	M	1	3.60 ± 0.50	1.03 ± 0.15	1.00 ± 0.02	E
				2	5.04 ± 1.71	1.32 ± 0.05	1.18 ± 0.03	F
M A S	A B I O T I C A	M A C	1	3.65 ± 0.58	2.65 ± 0.13	4.37 ± 0.02	G	
			2	5.21 ± 1.07	3.13 ± 0.12	5.70 ± 0.04	H	
L I P O S O M A S	A B I O T I C A	M	1	1.72 ± 0.06	3.88 ± 0.27	2.66 ± 0.19	I	
			2	1.89 ± 0.22	4.42 ± 0.36	3.81 ± 0.11	J	
	M A C		1	1.68 ± 0.23	5.68 ± 0.45	2.01 ± 0.04	K	
			2	2.88 ± 0.27	7.02 ± 0.97	2.89 ± 0.13	L	
	A B I O T I C A	M	1	9.90 ± 0.67	7.32 ± 1.10	1.62 ± 0.02	M	
			2	<u>10.45 ± 1.43</u>	7.42 ± 0.92	1.68 ± 0.11	N	
M A C		1	6.78 ± 0.68	5.41 ± 0.50	3.61 ± 0.37	O		
		2	8.12 ± 1.02	6.33 ± 0.60	5.47 ± 0.08	P		

Porcentajes de conversión a Aldosterona bajo distintas condiciones. Los valores se informan como promedio de triplicados ± Error-estándar. Para el tratamiento estadístico de los datos ver el texto.

y 3,3) (Líneas horizontales A a F e I a P). Solamente dos líneas, G y H, exhiben cantidades de Aldo algo mayores a pH 7,4, pero estas cantidades están lejos de ser las óptimas.

Para los dos niveles de pH más ácidos se observan como mejores condiciones las dos subrayadas en la Tabla 13, o sea línea D del pH 4,8 y línea N del pH 3,3.

Veamos ahora el resultado de análisis estadísticos.

Si a partir de un primer ANOVA de 5 factores se ha ce un análisis exploratorio de los datos teniendo en cuen ta sobre todo, las interacciones significativas, se llega a las siguientes conclusiones:

a) Considerando el factor pH en sus 3 niveles, este factor presenta diferencias significativas ($p < 0.01$) que dejan de serlo cuando se elimina del análisis el nivel pH 7.4.

b) El factor tiempo es significativo en ambos casos de pH, teniendo valores más altos para el tiempo 2 hs.

Una ANOVA de 4 factores, con pH, a 2 niveles, o sea "estado del precursor-conversión-precursor-pH a 2 niveles" para los datos del tiempo 2 hs. demuestra que las interacciones entre estos 4 factores son significativas. Luego, mediante Intervalos de Confianza para la diferencia de medias del 95%, se deduce que no hay diferencias significativas entre el valor de la línea D-pH 4.8 con el de la línea N-pH 3.3. Por consiguiente estos valores son los óptimos.

Una tercera condición, incubación de M a pH 3,3 (línea B-pH 3,3) exhibe igualmente un valor alto para la producción de Aldo, pero su alta variación (error estándar), debida a que los valores de los triplicados son muy dispersos conforma un intervalo que comprende a todos los otros intervalos.

En la Tabla 13 no se muestran las conversiones obtenidas con precursores encerrados en liposomas de grasa subcutánea (liposomas blanco) ya que ellas fueron consistentemente insignificantes.

De todas las condiciones óptimas para la producción de Aldo, la de la "línea D-pH 4.8" (Tabla 13) es la de mayor interés bioquímico. Las razones para esto son varias. En primer lugar porque algunas organelas de la célula viva, tales como lisosomas (153) (154) y receptosomas (155) (156), poseen aproximadamente el mismo pH. En segundo lugar porque, de acuerdo a la teoría quimiosmótica de Mitchell sobre la respiración dependiente del transporte de iones (157) la transferencia de electrones a lo largo de los transportadores de la cadena respiratoria que están localizadas en la membrana interna de la mitocondria, genera un gradiente de protones a través de esta membrana, formándose así una zona con alta densidad de iones hidrógeno. Por último como tercera razón debe mencionarse que, bajo las condiciones óptimas para la biosíntesis de Aldo a pH 4,8, los altos valores de conversión pueden ser ad-

judicados a una reacción enzimática (Tabla 13, restar línea H de línea D para el pH 4,8) en contraste con las otras dos condiciones óptimas mencionadas.

En la Tabla 14 se muestran los porcentajes de la Aldosterona formada, bajo distintas condiciones de incubación, cuando se efectuó la preincubación de las glándulas en el medio buffer, durante 20 minutos, antes de agregar el precursor radiactivo. Como puede verse los porcentajes obtenidos son o menores o iguales a los obtenidos en las incubaciones sin preincubación de las glándulas (líneas A a D e I a L de la Tabla 13).

En las Tablas 15 y 16 se muestran los porcentajes de 18-OH-B y 18-DAL respectivamente, remanentes al término de las incubaciones. En ellas puede verse que cuando el precursor era 18-OH-B, las cantidades de este esteroide al cabo de la incubación disminuye a medida que desciende el pH, siendo particularmente bajos en aquellos casos en los que han formado otros metabolitos en cantidad apreciable (Ver Tablas 17 y 18). Por otro lado, al partir de MAC como precursor siempre se obtiene 18-OH-B forma M, aumentando la cantidad de éste a medida que aumenta el pH. Todo esto habla en favor de la existencia de un estado de equilibrio entre 18-OH-B y 18-DAL. De todas formas es muy relevante destacar que este estado dinámico entre 18-OH-B y 18-DAL es distinto en presencia que en ausencia de tejido. En efecto, viendo

TABLA 15

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
L I B R E	BIOTICA	M	26,7 ^b	40,1 ^b	50,5 ^b
		MAC	12,5 ^b	17,2 ^a	30,6 ^b
	ABIOTICA	M	10,5 ^a	45,2 ^b	80,1 ^b
		MAC	12,6 ^b	40,6 ^b	68,4 ^a
LIPOSOMAS	BIOTICA	M	34,4 ^b	45,2 ^a	54,6 ^a
		MAC	22,6 ^b	37,6 ^a	60,8 ^b
	ABIOTICA	M	7,6 ^b	58,4 ^b	70,2 ^a
		MAC	14,3 ^b	40,3 ^b	64,9 ^b

18-OH-B-³H remanente (%) al término de las incubaciones realizadas, según la Sección V de Materiales y Métodos, durante 2 horas. Los valores informados son promedios de duplicados (a) o triplicados (b).

TABLA 16.

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
LIBRE	BIOTICA	M	65,4 ^b	20,1 ^b	7,3 ^b
		MAC	73,3 ^b	66,0 ^a	45,9 ^b
	ABIOTICA	M	50,8 ^a	39,3 ^b	12,7 ^b
		MAC	64,1 ^b	51,5 ^b	14,6 ^b
LIPOSOMAS	BIOTICA	M	32,1 ^b	31,6 ^a	10,9 ^a
		MAC	45,7 ^b	30,2 ^b	17,4 ^a
	ABIOTICA	M	27,9 ^b	44,8 ^b	23,4 ^a
		MAC	38,4 ^b	46,3 ^a	30,3 ^b

Porcentajes de producción de 18-DAL tritiada obtenidos en las incubaciones realizadas, según la Sección V de Materiales y Métodos, durante 2 horas. Los valores informados son promedios de duplicados (a) o triplicados (b).

TABLA 17.

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	PH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
L I B R E	ABIOTICA	M	2,86	1,93	1,14
		MAC	2,15	1,84	0,93
	BIOTICA	M	3,12	2,07	0,98
		MAC	4,09	3,01	0,76

Porcentajes de producción de la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 5,26 obtenidos en las incubaciones realizadas, según la Sección V de Materiales y Métodos, durante 2 horas.

TABLA 18

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH	pH	pH
			3,3	4,8	7,4
L I B R E	BIOTICA	M	7,21 ^a	7,39 ^a	3,12 ^a
		MAC	12,84 ^b	5,28 ^a	2,24 ^b
	ABIOTICA	M	11,23 ^b	11,09 ^a	1,76 ^b
		MAC	19,91 ^a	9,37 ^b	0,94 ^a
LIPOSOMAS	BIOTICA	M	23,18 ^b	5,19 ^a	2,36 ^a
		MAC	17,14 ^b	6,21 ^a	1,42 ^a
	ABIOTICA	M	8,13 ^b	7,14 ^a	3,89 ^b
		MAC	10,82 ^b	4,07 ^b	2,20 ^a

Porcentajes de producción de la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 6,33 obtenidos en las incubaciones realizadas, según la Sección V de Materiales y Métodos, durante 2 horas. Los valores informados son pro medios de duplicados (a) o triplicados (b).

los porcentajes de 18-DAL (Tabla 16) éstos son mayores en ausencia de tejido, sobre todo a pHs bajas.

En las Tablas 17 y 18 se listan los porcentajes correspondientes a las zonas radiactivas reveladas en la cromatografía del incubado en el sistema Bush B₅ con R_f 0,63 (R_M 5,26) y R_f 0,75 (R_M 6,33). Estas zonas radiactivas se corresponden con dos de las formas menos polares de 18-OH-B que componen el MAC (Ver Materiales y Métodos). Resultan destacables de mencionar los altos valores correspondientes al R_M 6,33 (Tabla 18) que se obtienen bajo distintas condiciones. Por la cinética de formación a partir de 18-OH-B + HCl, se ve que esta fracción se compone de un metabolito de 18-DAL (6), lo cual podría tener consecuencias cinéticas (Ver Discusión) sobre la capacidad precursora para Aldosterona.

Finalmente, en las Tablas 19, 20 y 21 se dan, para algunas de las incubaciones realizadas, los porcentajes correspondientes a los tres compuestos separados a partir de la zona radiactiva de menor polaridad en la cromatografía en papel (Figura 29): una forma menos polar de MAC correspondiente a R_M 7,18 (6); el material saponificable a 18-OH-B (MS); y el dímero de Aldosterona, para algunas incubaciones.

T A B L A 19

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
LIBRE	BIOTICA	M	5,0	11,8	2,9

Porcentajes de producción de la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 7,18, obtenidos en algunas de las incubaciones realizadas según la Sección V de Materiales y Métodos.

T A B L A 20

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
LIBRE	BIOTICA	M	2,4	2,5	0,29

Porcentajes de producción de la FMPA obtenidos en algunas de las incubaciones realizadas según la Sección V de Materiales y Métodos.

T A B L A 21.

ESTADO DEL PRECURSOR	TIPO DE CONVERSION	PRECURSOR	pH 3,3	pH 4,8	pH 7,4
LIBRE	BIOTICA	M	2,4	2,5	3,2
LIPOSOMAS			1,8	2,2	2,8

Porcentajes de producción de MS obtenidos en algunas de las incubaciones realizadas según la Sección V de Materiales y Métodos.

IV) INCUBACIONES DE MAC-TRITIADA CON CANTIDADES CRECIENTES DE 18-DAL.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la formación de Aldo a partir de MAC (Tabla 13, "línea D-pH 4.8), se realizaron incubaciones en esas mismas condiciones y en las mejores condiciones de pH 7,4 (Tabla 13, "línea D-pH 7,4"), pero ahora en presencia de cantidades crecientes de 18-DAL radioinerte (Tabla 22).

Al ir aumentando la cantidad de 18-DAL agregada al medio de incubación, el porcentaje de Aldo radiactiva obtenida va disminuyendo mientras que la radiactividad correspondiente a 18-DAL va aumentando. Esto estaría indicando que el compuesto del MAC que se convierte a Aldo, en esas condiciones, es 18-DAL. Es de hacer notar que la disminución en la radiactividad de Aldo no se relaciona exactamente con el aumento en la radiactividad correspondiente a 18-DAL. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que 18-DAL, 18-OH-B y las otras formas menos polares de este último esteroide, se hallan en equilibrio por lo que la determinación de 18-DAL no se correspondería con la cantidad de 18-DAL formada en el medio de incubación, pudiéndose desplazar dicho equilibrio de una forma no conocida durante el método de determinación.

T A B L A 22

18 - DAL radioinerte (Ug)	% Aldo- ³ H producido		% 18-DAL- ³ H remanente	
	pH 4,8	pH 7,4	pH 4,8	pH 7,4
0	8,93	5,40	60,37	45,77
10	2,96	1,85	52,41	48,91
100	0,41	0,24	76,50	78,35
1000	ND	ND	92,13	90,12

Porcentajes de Aldo formada en incubaciones de cuartos de adrenales de rata, durante 2 horas, con MAC tritiado en presencia de distintas cantidades de 18-DAL radioinerte.

ND = no detectable.

V) CURSO DE REACCION PARA LA FORMACION DE ALDO A PARTIR DE 18-OH-B.

Las Figuras 30 y 31 muestran el Curso de reacción para la biosíntesis de 18-DAL; 18-OH-B y Aldo a partir de $1,2\text{-}^3\text{H-18-OH-B}$ con cuartos de adrenales de rata a los pHs 4,8 y 7,4. En ella se puede ver que cualitativamente 18-DAL se comporta como un intermediario mientras que Aldo lo hace como producto final de la reacción, independientemente del pH. Desde el punto de vista cuantitativo, a pH 7,4 la formación de Aldo es menor; mientras que 18-DAL presenta, a este mismo pH, mayor dispersión y una curva tipo intermediario de reacción, aunque menos simple o evidente que a pH 4,8.

De esta forma puede asignarse la secuencia biosintética $18\text{-OH-B} \longrightarrow 18\text{-DAL} \longrightarrow \text{Aldo}$ (Figura 32), a ambos pHs.

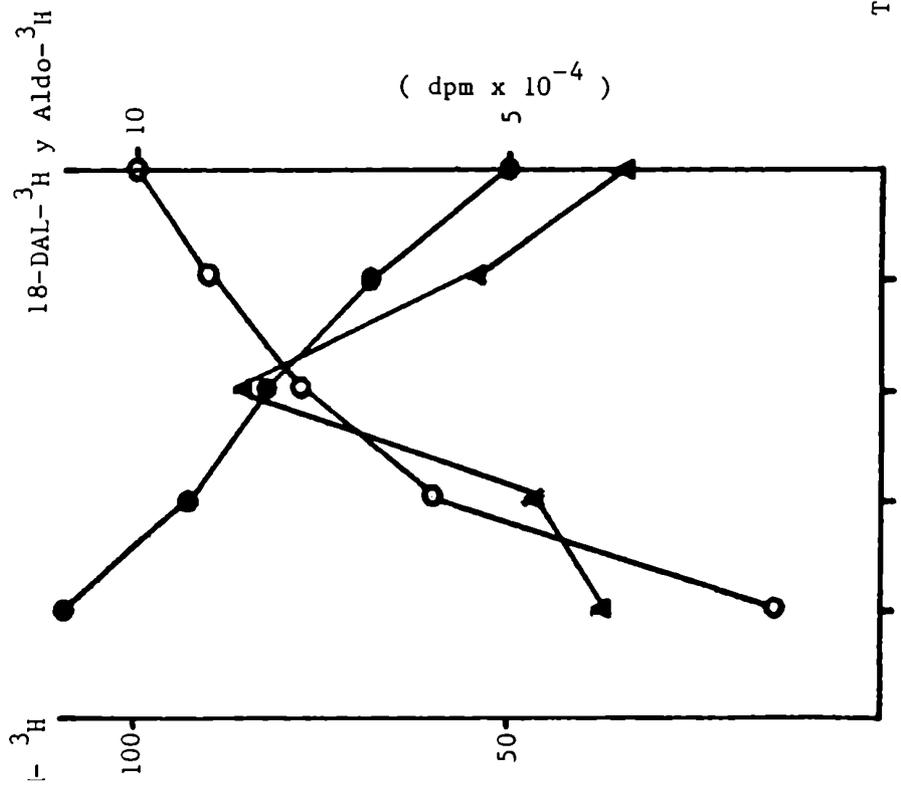


Figura 30: Curso de reacción para la formación de 18-DAL (●) y Aldo (○) a partir de 18-OH-B (●) a pH 4,8.

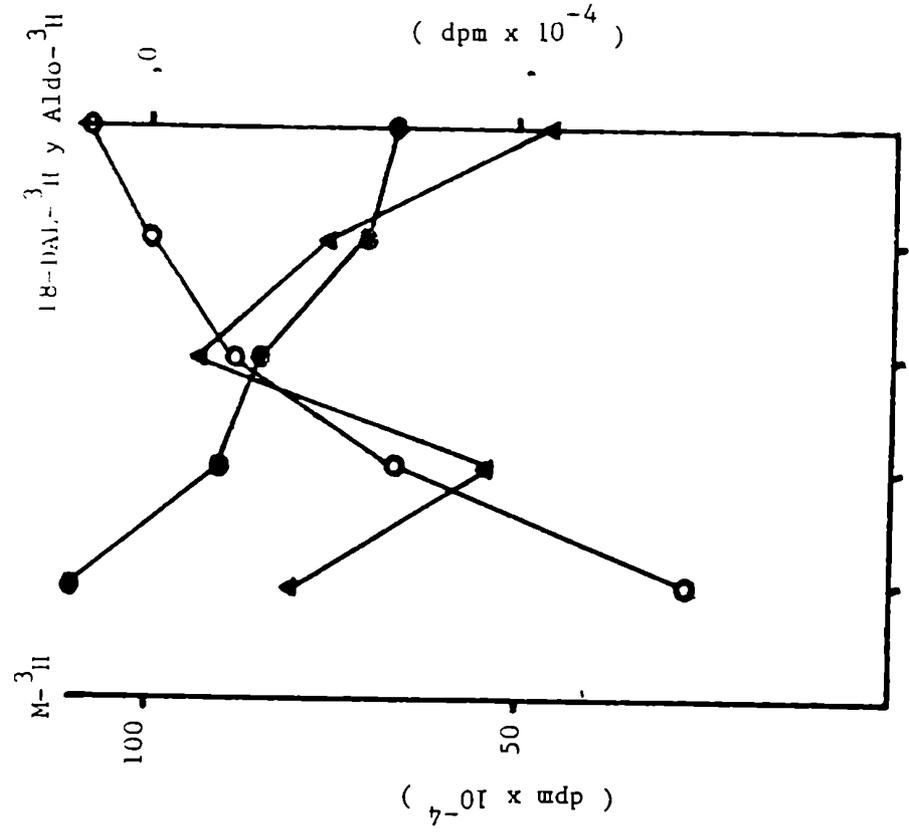


Figura 31: Curso de reacción para la formación de 18-DAL (●) y Aldo (○) a partir de 18-OH-B (●) a pH 8.

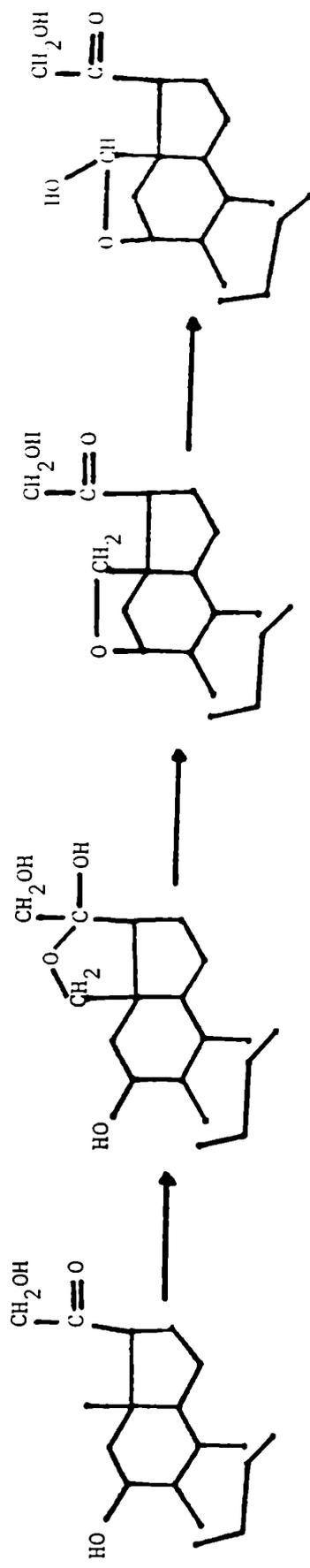


Figura 32: Compuestos probados como intermediarios a lo largo del camino biosintético de Aldosterona a partir de Corticosterona.

VI) EXPERIMENTOS DE CAPTURA.

Al incubar B tritiada con cuartos de adrenales de rata a pH 4,8 en presencia de cantidades crecientes de 18-OH-B (forma M) radioinerte, se ve que la radiactividad de Aldo disminuye al igual que la de 18-DAL, mientras que la de 18-OH-B (M) aumenta (Tabla 23). Lo mismo se evidencia a pH 7.4.

Al incubar B tritiada a pH 4,8 en presencia de cantidades crecientes de 18-DAL radioinerte, la radiactividad de Aldo disminuye mientras que la de 18-DAL aumenta (Tabla 24). El mismo comportamiento se evidencia a pH 7,4.

Por último, al incubar 1,2-³H-18-OH-B con cuartos de adrenales de rata a pH 4.8 en presencia de cantidades crecientes de 18-DAL radioinerte, la radiactividad correspondiente a Aldo disminuye mientras que la de 18-DAL aumenta (Tabla 25). Al realizar el mismo experimento a pH 7,4, se encontraron dificultades en la medición de Aldo, quizás debido a sus pequeñas cantidades, obteniéndose resultados muy dispersos.

Esta serie de experimentos habla en favor de un camino biosintético $B \longrightarrow 18-OH-B \longrightarrow 18-DAL \longrightarrow Aldo$ (Figura 32) a ambos pHs.

T A B L A 23.

M (ng)	% 18-OH-B- ³ H	% 18-DAL- ³ H	% Aldo- ³ H
0	7,0	5,1	11,3
1	9,3	5,3	8,0
10 ²	11,4	4,2	4,9
10 ⁴	12,7	2,1	2,6
10 ⁶	15,9	1,5	1,7

Efecto del aumento de 18-OH-B (M) radioinerte sobre la producción de 18-DAL-³H y Aldo-³H a partir de B-³H a pH 4,8.

T A B L A 24

18-DAL (ng)	% 18-DAL- ³ H	% Aldo- ³ H
0	4,5	10,5
1	6,5	7,1
10 ²	9,1	3,7
10 ⁴	10,6	1,3
10 ⁶	11,3	0,5

Efecto del aumento de 18-DAL radioinerte sobre la producción de Aldo-³H a partir de B-³H a pH 4,8.

T A B L A 25

18-DAL (ng)	% 18-DAL- ³ H	% Aldo- ³ H
0	14,7	7,0
1	15,2	6,2
10 ²	16,8	4,3
10 ⁴	17,9	2,1
10 ⁶	20,1	0,5

Efecto del aumento de 18-DAL, radioinerte sobre la producción de Aldo-³H a partir de 18-OH-B-³H a pH 4,8.

VII) REQUERIMIENTOS PARA LAS OXIDACIONES DE 18-OH-B Y 18-DAL PARA DAR ALDO.

a) Requerimiento de NADPH.

En la Tabla 26 se muestran los porcentajes de Aldo tritiada obtenidos a partir de los precursores 18-OH-B y 18-DAL en las condiciones indicadas en la Tabla 13 "línea D- pH 4,8", pero con el agregado de distintos cofactores. Se puede ver que siempre 18-DAL funciona como un mejor precursor para Aldo que 18-OH-B. Por otro lado, el sistema generador de NADPH (malato + NADP^+) produce aumento de la producción de Aldo llegándose a un 16% de rendimiento con malato 9 mM.

Estos resultados junto al aumento de la síntesis por NADPH o malato sólo, indicarían que las oxidaciones de 18-OH-B y 18-DAL para dar Aldo requieren NADPH en vez de NADP^+ . Marusic y col. (93), y más recientemente Kojima y col. (82) y Aupetit y col. (95) obtuvieron los mismos resultados a partir de 18-OH-B a pH 7.4.

b) Requerimiento de O_2 .

En la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos al incubar 18-OH-B y 18-DAL tritiados a pHs 7,4 y 4,8 en Atmósfera de carbógeno o de Nitrógeno. Puede verse que la producción de Aldo tritiada en atmósfera de Oxígeno es mucho mayor que la correspondiente en atmósfera de Nitrógeno, haciéndose este efecto más pronunciado a pH 4,8 que a pH 7,4. Estos resultados indicarían un requerimiento de

T A B L A 26.

Malato (mM)	NADP ⁺ 0.5 mM	NADPH 0.5 mM	% Aldosterona- ³ H desde M- ³ H	% Aldosterona- ³ H desde MAC- ³ H
---	---	+	4.98	5.84
---	+	---	2.98	4.62
0.15	+	---	5.37	6.56
0.60	+	---	6.45	8.92
1.20	+	---	8.67	11.24
3.00	+	---	11.58	15.67
9.00	+	---	13.27	16.22
9.00	---	---	7.48	8.09
---	---	---	3.24	4.41

T A B L A 27

Precursor	pH	Aldo producida bajo Carbógeno
		Aldo producida bajo N ₂
18-OH-Bi	4,8	7,1
	7,4	4,5
18-DAL	4,8	8,2
	7,4	5,3

Producción comparativa de Aldo bajo atmósferas de Carbógeno o de Nitrógeno, a partir de dos precursores y a dos pHs.

Oxígeno para la biosíntesis de Aldo a partir de los precursores probados. Kojima y col. (81) (82) demostraron recientemente los mismos requerimientos a partir de 18-OH-B a pH 7,4.

Estos experimentos sobre requerimientos de O_2 y NADPH permiten concluir que la oxidación requerida para que se produzca Aldo a partir de los precursores usados, consiste en una hidroxilación. Teniendo en cuenta los resultados descritos en las Secciones V y VI de Resultados, se concluye que tal hidroxilación debe ocurrir sobre 18-DAL (Figura 33).

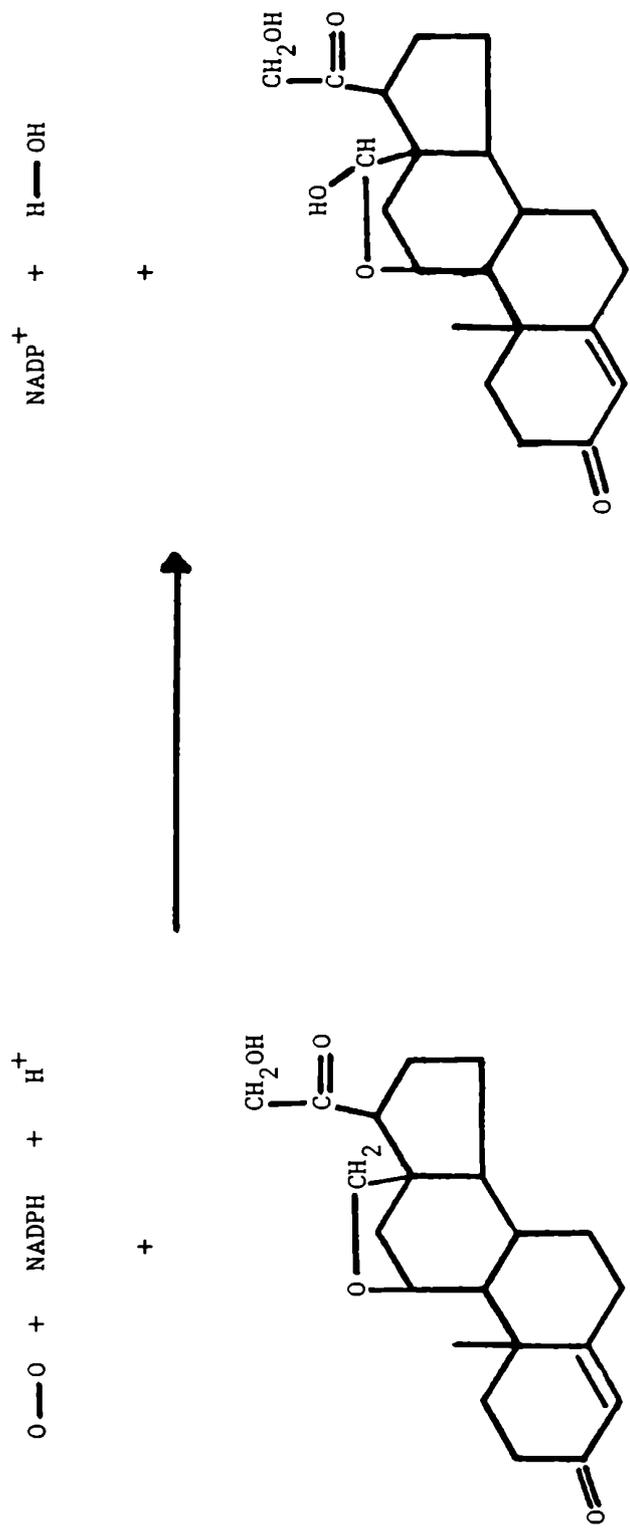


Figura 33: Reacción de hidroxilación de 18-DAL para dar Aldo.

VIII) CAPACIDAD PRECURSORA PARA ALDOSTERONA DE OTROS
PRECURSORES.

a) Formas menos polares de 18-OH-B de R_M 5,26; 6,33 y 7,18.

La incubación a pH = 7,4 de cualquiera de las formas menos polares de la 18-OH-B con excepción de R_M 4.33 llevó constantemente a la formación, en proporciones semejantes, de las 4 formas menos polares (R_M 4.33; R_M 5.26; R_M 6.33 y R_M 7.18) y a la formación de una cantidad mucho mayor de 18-OH-B (entre 70 y 90%) (Tabla 28).

La cantidad de precursor remanente fue en todos los casos muy pequeña y demostró variaciones de escasa cuantía. Por otro lado los porcentajes de conversión a Aldo siempre fueron muy bajos (Tabla 28).

Resulta así que las formas menos polares de 18-OH-B de R_M 5,26; 6,33 y 7,18 poseen muy baja capacidad precursora para Aldo y que más bien revierten a 18-OH-B "M" por efectos de la incubación.

En las incubaciones realizadas con los mismos precursores en ausencia de tejido no se obtuvo producción de Aldo pero sí de 18-OH-B "M". Estos resultados parecen demostrar que la formación de 18-OH-B y de sus formas menos polares durante las incubaciones con estos precursores, se debería a conversiones espontáneas.

b) Material saponificable a 18-OH-B (MS).

De las incubaciones de MS bajo distintas condiciones, surge que este precursor se transforma enzimáticamente

T A B L A 28.

Precursor	% Aldo	% 18-OH-B
R _M 5,26	0,52	68,7
R _M 6,33	0,91	50,1
R _M 7,18	0,82	92,1

Porcentajes de Aldo y de 18-OH-B formadas durante las incubaciones de las formas menos polares de 18-OH-B de R_M 5,26; R_M 6,33 y R_M 7,18 con cuartos de adrenales de rata, a pH 7,4, durante 2 horas.

a 18-OH-B y Aldo. En efecto, en la Tabla 29 se ve que a los dos pHs usados MS se transforma a 18-OH-B en mayor proporción en presencia de cuartos de adrenales de rata, que en su ausencia. Sin embargo el comportamiento a pH 4,8 es cuantitativamente mayor. Esto podría suceder debido a la mayor hidrólisis que MS sufriría a pH más ácido.

El porcentaje de Aldo obtenido en todos los casos ensayados fue muy bajo (Tabla 29) por lo que MS no resulta buen precursor para Aldo.

En la Tabla 30 se muestra que la presencia de 18-OH-B radioinerte en el medio de incubación de MS tritiado inhibe totalmente la producción de Aldo radiactiva, y aumenta la radiactividad asociada a 18-OH-B (forma M).

T A B L A 29.

Precursor	Tipo de Conversión	Compuesto Cuantificado	pH 4,8	pH 7,4
MS- ³ H	Biótica	18-OH-B	0.553 ± 0.021	0.310 ± 0.019
		Aldo	0.058 ± 0.008	0.008 ± 0.002
		18-OH-B	0.230 ± 0.030	0.090 ± 0.010
	Abiótica	Aldo	No Detectable	No Detectable

Conversiones de 1,9 pmoles de MS , en presencia y ausencia de tejido adrenal. Los valores se informan como promedio ± error estandard, en pmoles.

T A B L A 30.

pH	18-OH-B (μg)	18-OH-B- ^3H	Aldo- ^3H
	0	0.553 \pm 0.021	0.058 \pm 0.008
4.8	41	0.619 \pm 0.033	0.004 \pm 0.001
	87	0.641	No Detectable
	0	0.310 \pm 0.019	0.008 \pm 0.023
7.4	41	0.352 \pm 0.023	No Detectable
	87	0.340	No Detectable

Conversiones a 18-OH-B- ^3H y Aldo- ^3H a partir de 1,9 pmoles de MS tritiado y a dos pHs, en presencia de 18-OH-B radioinerte. Excepto los experimentos con 87 μg de 18-OH-B ($n = 1$), el resto se realizaron por triplicado, informándose el promedio \pm error estándar en pmoles.

IX) LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS BIOSINTESIS DE ALDO
Y DE MS.

En las Figuras 34 y 35 se muestran las curvas de tejido y de tiempo para la producción de MS a partir de 18-OH-B y 18-DAL a pH 7.4. En ellas se ve que los máximos valores de tejido y de tiempo que se hallan sobre la zona recta del gráfico son 50 mg y 30 minutos respectivamente.

En la Figura 36 se muestra la curva de tiempo para la producción de Aldo a partir de 18-OH-B y 18-DAL con homogenato de 50 mg de tejido adrenal. De ella se obtuvo el máximo valor de tiempo que se halla sobre la zona recta del gráfico: 30 minutos.

Estas condiciones son las utilizadas luego para las incubaciones correspondientes a determinar la localización subcelular de las biosíntesis de MS Y de Aldo: las fracciones H, N, M, m y S provenientes de 50 mg de tejido adrenal se incubaron durante 30 minutos con 1,8 μ Ci de 18-OH-B ó 18-DAL ($A_e = 6,9 \mu$ Ci/ μ mol), determinándose luego MS y Aldo tritiados.

En la Tabla 31 se muestran las actividades enzimáticas de Succínico Deshidrogenasa, de la producción de Aldo, y de la producción de MS. En ella se puede ver que estas tres actividades enzimáticas se corresponden, hallándose el máximo valor de todas en la fracción M. De la misma forma, el máximo valor de Actividad específica (Tabla 32)

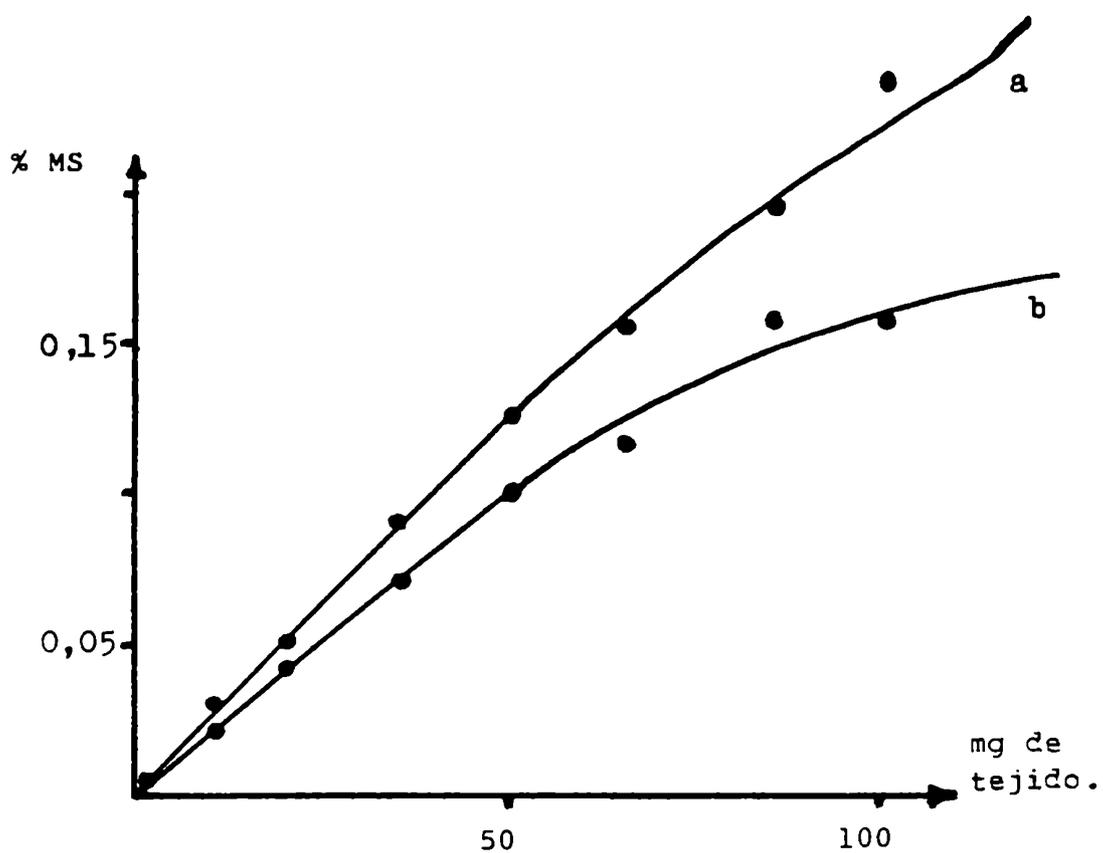
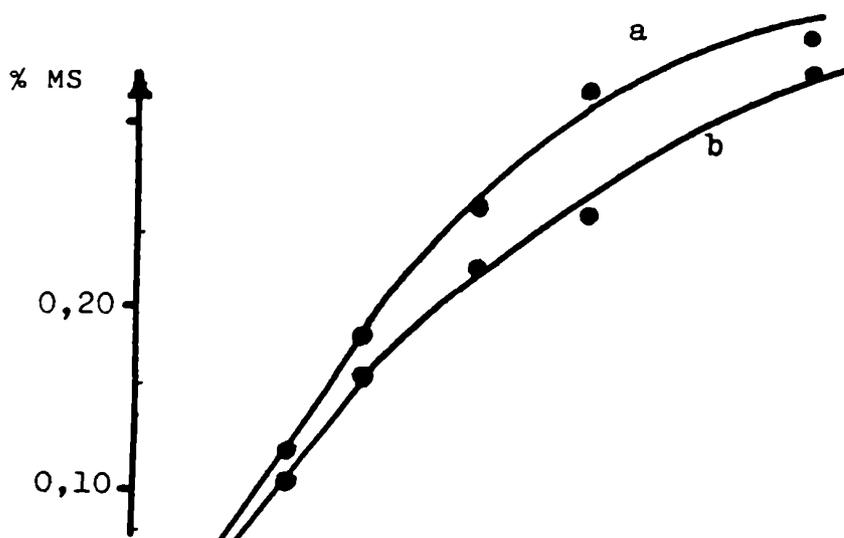


Figura 34: Curvas de tejido adrenal para la producción de MS (%) al incubar 18-OH-B-³H (a) o 18-DAL-³H (b) durante 20 minutos a pH 7,4.



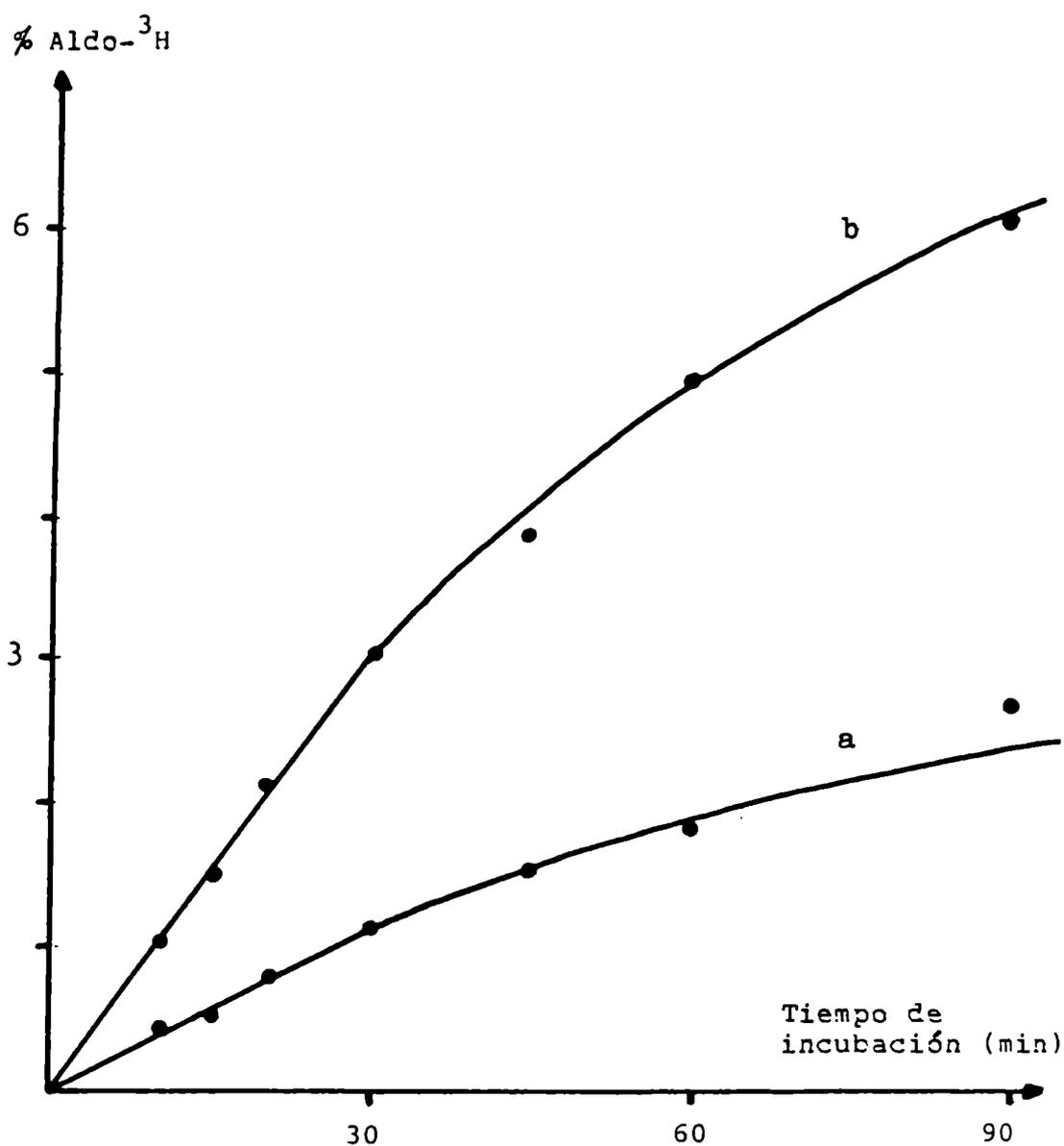


Figura 36: Curva de tiempo para la producción de Aldo a partir de 18-OH-B-³H (a) o 18-DAL-³H (b) con homogenato de 50 mg de tejido adrenal, a pH 7,4, en presencia de malato 5 mM y NADP⁺ 0,5 mM.

T A B L A 31.

Actividades enzimáticas de la enzima marcadora mitocondrial (SDH); de la biosíntesis de Aldo a partir de 18-OH-B y 18-DAL a pH 7,4 y pH 4,8; y de la biosíntesis de MS a partir de 18-OH-B y 18-DAL a pH 7,4; en las fracciones subcelulares H, N, M, m y S indicadas en la Figura 24. Para las definiciones de Unidad enzimática ver la Sección XI de Materiales y Métodos.

T A B L A 31.

UNIDADES ENZIMÁTICAS DE	FRACCIONES SUBCELULARES				
	H	N	M	m	S
Succínico Deshidrogenasa (SDH)	2590	406	2093	12	0
18-OH-B a ALDO a pH 7,4	2,42	0,53	2,14	0	0
18-OH-B a ALDO a pH 4,8	8,34	1,53	7,16	0	0
18-DAL a ALDO a pH 7,4	7,67	1,25	6,81	0	0
18-DAL a ALDO a pH 4,8	11,44	1,99	9,64	0	0
18-OH-B a MS a pH 7,4	0,48	0,11	0,35	0	0
18-DAL a MS a pH 7,4	0,43	0,09	0,34	0	0

T A B L A 32

Actividades específicas de la enzima marcadora mitocondrial (SDH); de la biosíntesis de Aldo a partir de 18-OH-B y 18-DAL a pH 7,4 y pH 4,8; y de la biosíntesis de MS a partir de 18-OH-B y 18-DAL a pH 7,4; en las fracciones subcelulares H, N, M, m y S indicadas en la Figura 24.

T A B L A 32.

A C T I V I D A D E S E S P E C I F I C A S (UE/mg protefna) DE	F R A C C I O N E S S U B C E L U L A R E S				
	H	N	M	m	S
Succínico Deshidrogenasa (SDH)	32,4	23,6	112,4	4,6	0
18-OH-B a Aldo a pH 4,8	0,24	0,18	0,85	0	0
18-OH-B a Aldo a pH 7,4	0,80	0,52	2,85	0	0
18-DAL a Aldo a pH 4,8	0,76	0,43	2,71	0	0
18-DAL a Aldo a pH 7,4	1,07	0,68	3,84	0	0
18-OH-B a MS a pH 7,4	0,04	0,04	0,14	0	0
18-DAL a MS a pH 7,4	0,04	0,03	0,13	0	0

corresponde para las tres enzimas a la fracción M.

Por estas razones se concluye que Aldo y MS se biosintetizan a partir de 18-OH-B y de 18-DAL en las mitocondrias.

X) LOCALIZACION SUBMITOCONDRIAL DE LA BIOSINTESIS DE ALDO.

En las Figuras 37 y 38 se muestran las curvas de te jido y de tiempo para la producción de Aldo radiactiva a partir de B tritiada a pH 7,4. En ellas se puede ver que los valores de tejido y de tiempo correspondientes a 30mg y 20 minutos respectivamente, se hallan sobre la zona recta de cada gráfico. Por esta razón, estas condiciones fueron las utilizadas en los experimentos siguientes.

En la Tabla 33 se muestran las actividades enzimáticas de Succínico deshidrogenasa marcadora de Membrana interna, de Monoamina oxidasa marcadora de Membrana externa y de Adenilato quinasa marcadora de Espacio Intermembrana en cada una de las fracciones T, E, X e I obtenidas en el fraccionamiento mitocondrial, y en la fracción mitocondrial (M) del fraccionamiento subcelular. En ella se puede ver que la actividad total en mitocondrias de cada una de las enzimas marcadoras medidas es recuperadas eficientemente en alguna fracción submitocondrial particular. Por consiguiente se puede hacer la siguiente correlación:

Fracción T: mitoplastos

Fracción E: membrana externa y espacio
intermembrana.

Fracción X: membrana externa.

Fracción I: espacio intermembrana.

En la TABla 34 se lista la actividad enzimática de

T A B L A 33

Fracción	Actividad de SDH (UE)	Actividad de Aq (UE)	Actividad de MAO (UE)
M	31.775	3,32	101,53
T	27.138	0,00	7,23
E	841	3,14	90,33
X	726	0,04	86,72
I	56	2,99	0,72

Actividades enzimáticas (UE) de Succínico deshidrogenasa (SDH); Adenilato quinasa (Aq) y Monoaminoxidasa (MAO) en Mitocondrias (M) y en cada una de las fracciones submitocondriales T, E, X e I. Para la identificación de estas últimas así también como para las definiciones de UE, ver Materiales y Métodos.

TABLA 34.

Fracción	Actividad enzimática de formación de Aldo a partir de B (UE) en presencia de	
	malato 5 mM Y NADP ⁺ 0,5 mM	NADP 0,5 mM
M	17,25 ^a	15,16 ^a
T	8,39 ^b	6,25 ^b
E	1,28 ^b	4,37 ^b
X	0,43 ^b	0,84 ^b
I	0,35 ^a	0,43 ^b
T + E	9,64 ^a	--
T + X	5,35 ^a	--
T + I	6,36 ^a	--
T + X + I	7,55 ^a	--

Actividad enzimática de formación de Aldo a partir de B, bajo dos condiciones de incubación, en Mitocondrias (M), en cada una de las fracciones submitocondriales, y en mezclas de ellas. Para la identificación de estas últimas así también como para detalles y condiciones de las incubaciones ver Materiales y Métodos. Se define una UE como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato en producto durante la incubación. Los resultados son promedios de: a:duplicados o b:triplicados.

producción de Aldo a partir de B en cada una de las muestras ensayadas y en las condiciones de incubación usadas. En ella se puede ver que en presencia de NADPH 0.5 mM sólo las muestra T y E presentan producción significativa de Aldo, aunque ninguna de ellas, ni aún su suma, logra recuperar la actividad mitocondrial. Por otro lado, cuando el medio de incubación es adicionado de malato 5 mM y NADP 0.5 mM la única fracción submitocondrial que produce Aldo es T, mientras que en las muestras de mezcla de fracciones submitocondriales, los mayores valores se logran al reconstituir artificialmente la mitocondria (T + E y T + X + I). Sin embargo tampoco en estas condiciones de incubación se recupera totalmente la actividad mitocondrial.

XI) EFFECTOS DEL ACTH.

En lo que sigue se presenta la tabla en la que se describen los rendimientos en pmoles de los cuatro metabolitos a dos pHs y dos concentraciones de ACTH a partir de dos precursores (Tabla 35). El rigor estadístico exige para la resolución de este sistema un análisis de varianza de 4 factores, uno de ellos (pH) de 2 niveles, y otro (concentración de trofina) de 3 niveles, con un número considerable de vías.

Este problema es colateral con respecto al tema principal de la tesis ya que aquí sólo nos interesa investigar supuestos rendimientos simétricos de MS con respecto a Aldo en presencia de ACTH.

Resultados que en base a este razonamiento deben considerarse como preliminares ya que se han obtenido empleando contrastes por t de Student para dos muestras sugieren que, independientemente del sustrato, la baja concentración de la ACTH aumenta la producción de Aldo tritizada mientras que la alta concentración de la trofina inhibe tal producción ($p < 0.05$). Sin embargo, tales efectos serían más pronunciados a pH 7,4 que a pH 4,8. De esta forma el sentido del efecto de la ACTH dependería de su concentración.

Por otro lado si se observa, en la misma tabla, la producción de MS, puede verse que ésta está influida por ACTH de manera inversa a la Aldo; esto es, aumenta la producción de MS a altas concentraciones de la ACTH, y dis-

T A B L A 35

Precursor	Compuesto Cuantificado	pH = 7,4			pH = 4,8		
		ACTH 3000 pmoles	ACTH 0,2 pmoles	CONTROL	ACTH 3000 pmoles	ACTH 0,3 pmoles	CONTROL
18-OH-B	Aldo	0.05* ± 0.01	0.24* ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.59* ± 0.02	0.98# ± 0.06	0.79 ± 0.04
	18-OH-B	10.42 ± 0.45	6.58 ± 0.36	10.12 ± 0.60	7.30 ± 0.44	6.06 ± 0.24	8.08 ± 0.46
	18-DAL	0.92 ± 0.05	1.17 ± 0.03	0.84 ± 0.03	3.27 ± 0.13	3.32 ± 0.17	2.46 ± 0.14
	MS	1.01* ± 0.04	0.33* ± 0.02	0.65 ± 0.04	0.66* ± 0.04	0.36# ± 0.03	0.47 ± 0.03
18-DAL	Aldo	0.38* ± 0.02	1.09* ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.92# ± 0.07	2.25* ± 0.13	1.27 ± 0.09
	18-OH-B	4.07 ± 0.13	1.97 ± 0.08	3.94 ± 0.11	1.81 ± 0.09	1.58 ± 0.07	2.27 ± 0.12
	18-DAL	7.41 ± 0.21	7.42 ± 0.22	6.18 ± 0.27	8.33 ± 0.25	9.34 ± 0.46	8.15 ± 0.21
	MS	0.91* ± 0.04	0.40* ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.68* ± 0.04	0.38# ± 0.03	0.51 ± 0.03

* Diferencia significativa con el control (p < 0.05).

Diferencia con el control a p < 0.10.

Rendimientos en pmoles de 4 metabolitos producidos en incubaciones de 18-OH-B o 18-DAL a pHs 7,4 ó 4,8, en ausencia (CONTROL) o en presencia de dos cantidades de ACTH (3000 pmoles ó 0,3 pmoles). Los resultados se expresan como X ± EE. Salvo el CONTROL de pH 4,8 que se realizó por duplicado, el resto de los experimentos se realizaron por triplicado.

minuye a bajas concentraciones de la trofina. Estos efectos también serían más pronunciados a pH 7,4 que a pH 4,8.

Estos resultados indicarían una dependencia de las producciones de Aldo de las de MS, la cual podría relacionarse con la regulación de los niveles de 18-OH-B y 18-DAL.

Luego se realizaron incubaciones con $1,2\text{-}^3\text{H-18-OH-B}$ a pHs 7,4 y 4,8 sin y con ACTH durante distintos tiempos de incubación. Los resultados se muestran en las Figuras 39 y 40.

En ellas se puede ver que a pH 7,4 (Figura 39) 0,3 pmoles de ACTH producen siempre aumento en la producción de Aldo tritiada, mientras que 3000 pmoles de trofina producen, a tiempos cortos, mayor cantidad de Aldo y a tiempos largos menores valores de Aldo, siempre con respecto a controles.

Por otro lado a pH 4,8 si bien se puede afirmar la misma tendencia, algunas diferencias dejan de ser significativas.

En estas mismas incubaciones también se semicuantificó MS. A pH 7,4 (Figura 41), a tiempos de incubación mayores de 60 minutos, 3000 pmoles de ACTH hacen aumentar la producción de MS, mientras con 0,3 pmoles de la trofina se obtienen menores valores. A tiempos menores de 60 minutos hay tendencia a la disminución de Aldo con ambas concentraciones de la trofina.

A pH 4,8 (Figura 42) se obtiene el mismo esquema que a pH 7,4 a tiempos largos. A tiempos cortos, 0,3 pmoles de

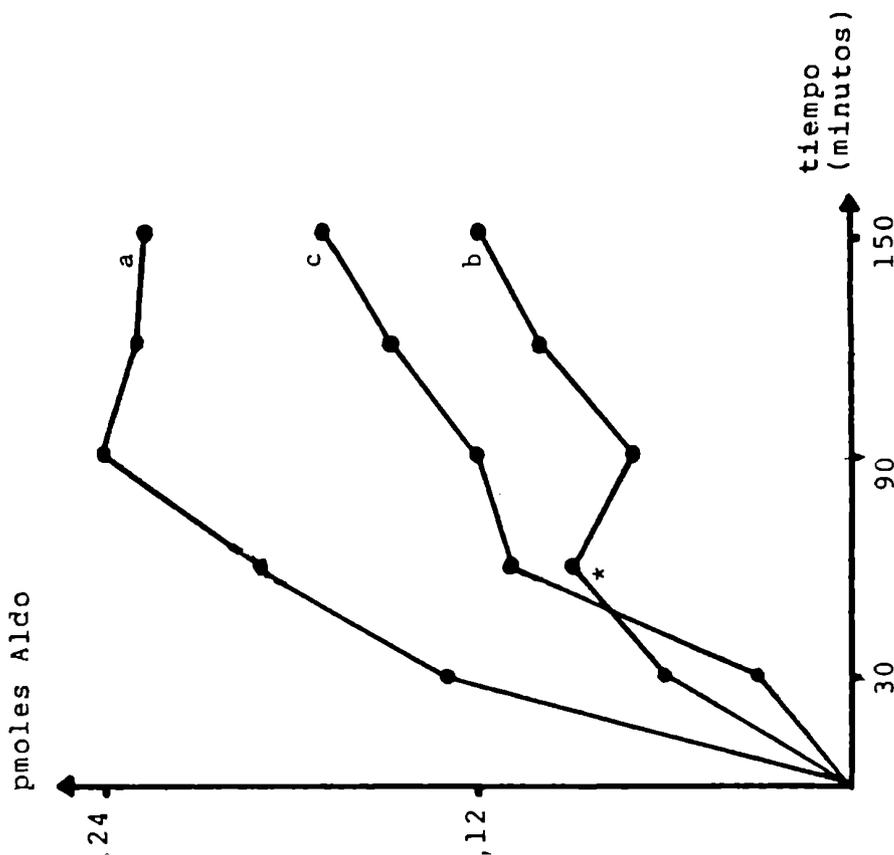


Figura 39: Producción de Aldo-³H al incubar 13,46 pmoles de 18-OH-B-³H a pH 7,4 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH, a distintos tiempos. $p < 0,05$ excepto * $p < 0,10$.

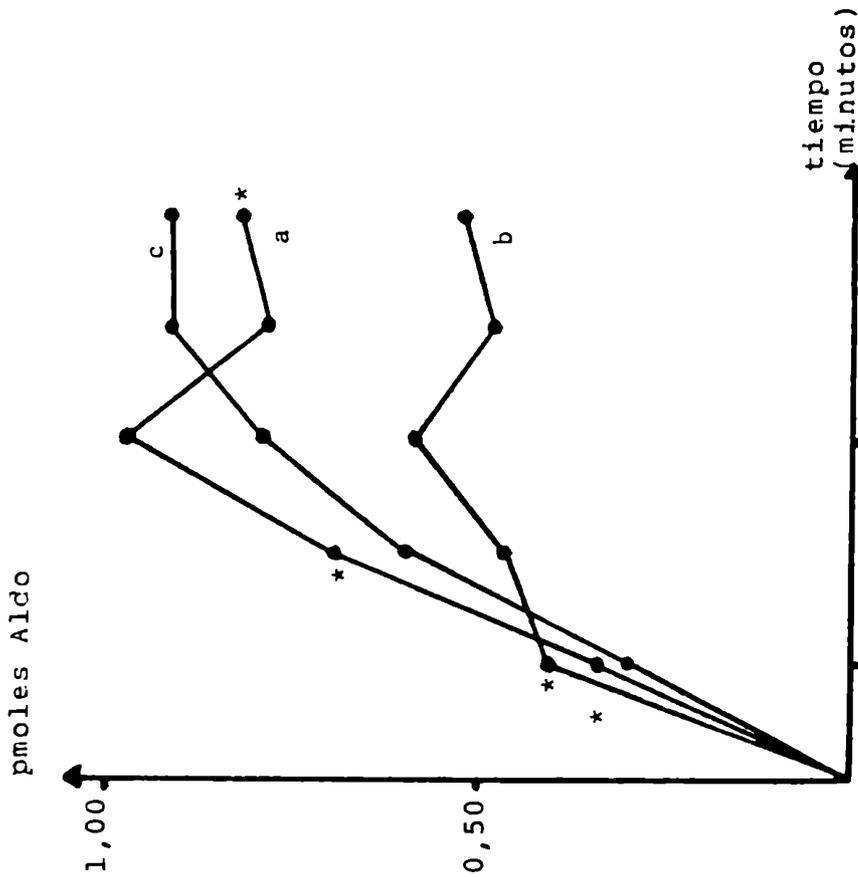


Figura 40: Producción de Aldo-³H al incubar 13,46 pmoles de 18-OH-B-³H a pH 4,8 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH, a distintos tiempos. $p < 0,05$ excepto * $p < 0,10$.

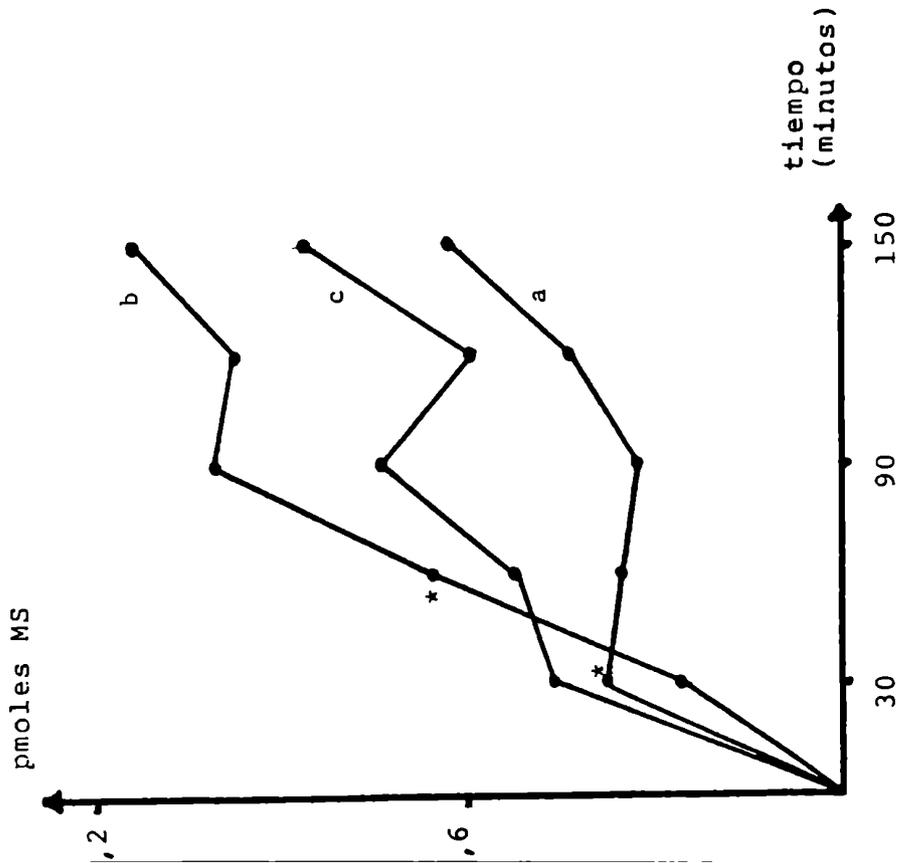


Figura 41: Producción de MS-³H al incubar 13,46 pmoles de 18-OH-B-³H a pH 7,4 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH a distintos tiempos. p < 0,05 excepto * p < 0,10.

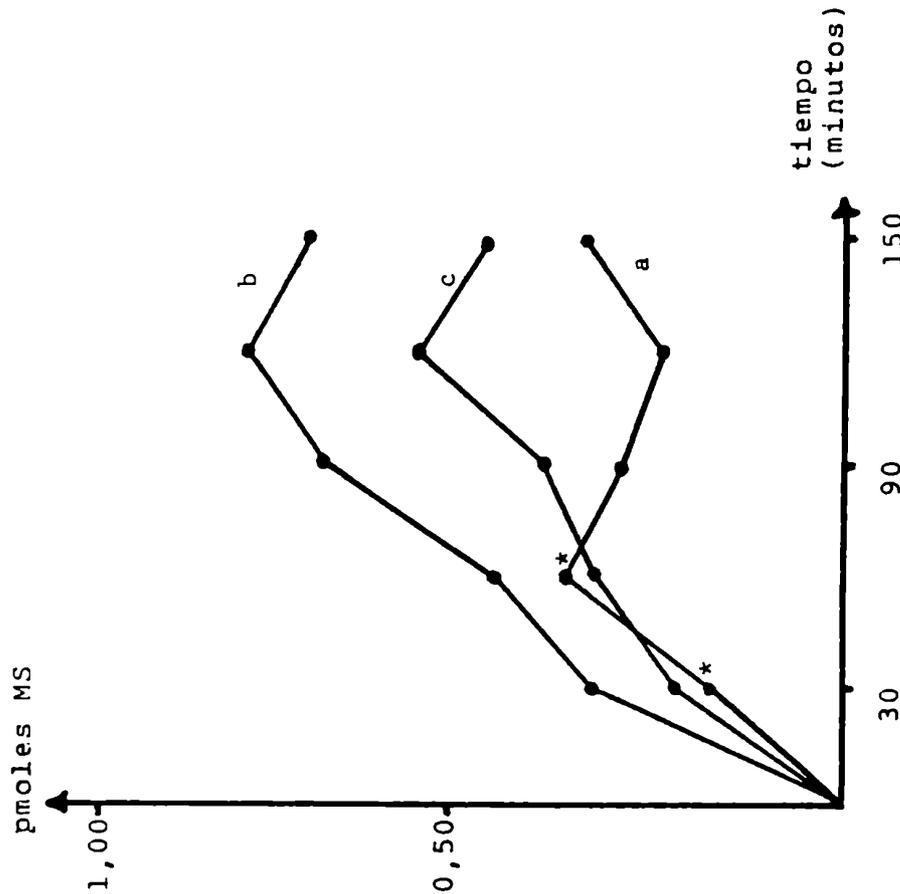


Figura 42: Producción de MS-³H al incubar 13,46 pmoles de 18-OH-B-³H a pH 4,8 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH a distintos tiempos. p < 0,05 excepto * p < 0,10.

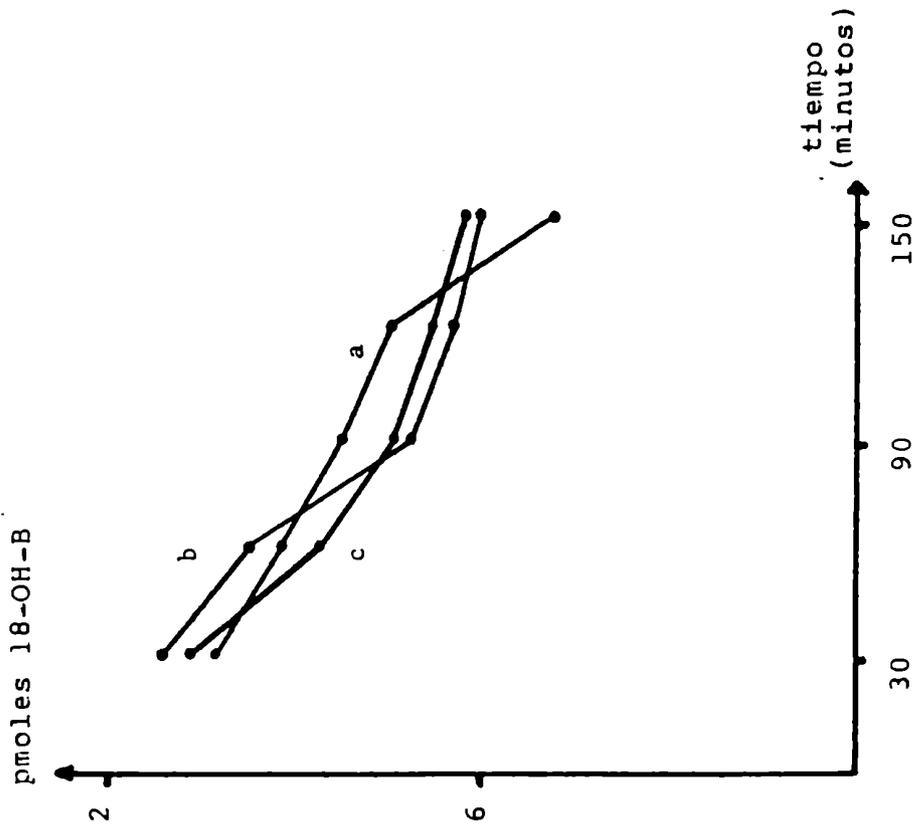


Figura 43: 18-OH-B-³H remanente al incubar dicho esteroide a pH 7,4 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH, a distintos tiempos.

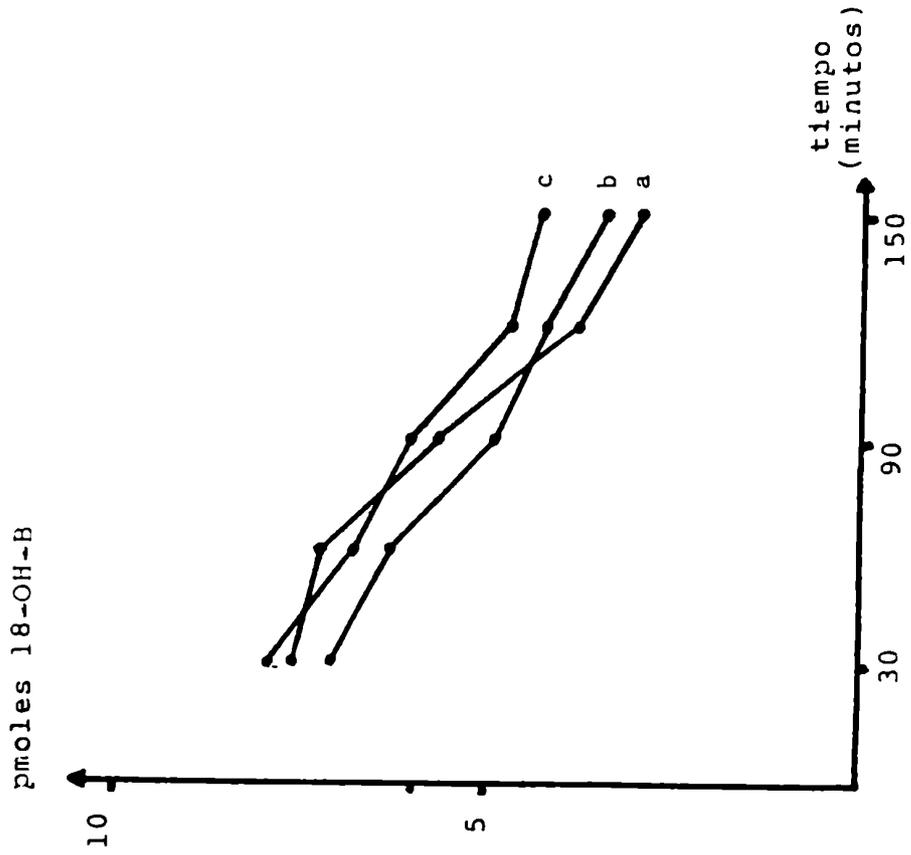


Figura 44: 18-OH-B-³H remanente al incubar dicho esteroide a pH 4,8 con adrenales de rata sin (c) y con 0,3 (a) ó 3000 (b) pmoles de ACTH, a distintos tiempos.

la ACTH aparentan no tener efecto con respecto a controles, mientras que 3000 pmoles aumentan la producción de MS.

Por último, independientemente del pH y de la concentración de ACTH, la 18-OH-B remanente (Figuras 43 y 44) disminuye linealmente con el tiempo.

D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

En el presente trabajo de Tesis se han obtenido las mayores conversiones de 18-OH-B a Aldo jamás informadas. Estas conversiones, iguales o mayores aún que las de B a Aldo, fueron obtenidas bajo diferentes condiciones (Table 13) todas las cuales tuvieron como común denominador el medio ácido en el cual la forma M de 18-OH-B adopta formas menos polares.

De esta manera se está ante un doble avance: por un lado la evidencia de que formas menos polares de 18-OH-B, sobre todo una de ellas, son intermediarias en la biosíntesis de Aldo y, por el otro, un nuevo aporte al papel cada vez más relevante que el medio ácido está tomando en procesos bioquímicos.

En efecto, no todo lo que ocurre a pHs muy ácidos es, al contrario de lo que se pensó hasta los años 70, artificial. Basta demostrar que algún proceso ocurra enzimáticamente o espontáneamente en una de las organelas de contenido ácido (Ver Resultados) para poder postular que estos procesos forman parte de fenómenos vitales. Las evidencias cada vez más concluyentes a favor de la Teoría de Mitchell no excluyen de esta posibilidad a la fase inmediatamente externa de la membrana interna de las mitocondrias (157). Los lisosomas tienen un pH entre 4 y 6 pero no se puede afirmar aún nada concreto acerca del pH de la capa de espesor de pocas moléculas asociada a la fase externa mencionada

Precursoriedad de 18-DAL

Uno de los resultados importantes del presente trabajo de Tesis con-

sistió en asignar definitivamente la estructura de 18-DAL al principal componente del MAC. Por otro lado, este compuesto ya había sido postulado por Ulick como buen precursor para la biosíntesis de Aldo en sapo, pero este autor no pudo hallar a la 18-DAL como un componente biosintetizado por dicha especie. Su rol como intermediario en la biosíntesis de Aldo a partir de B y de 18-OH-B ha sido ahora demostrado, pudiéndose escribir el camino biosintético representado en la Figura 32.

El hecho de que ocurran conversiones espontáneas desde M a 18-DAL y de los dos esteroides a Aldo sugiere la existencia de pasos no enzimáticos en la última parte del camino biosintético que lleva al mineralocorticoide. Para el caso analizado aquí de la transformación de M a 18-DAL, ésta podría ocurrir por alguna de las dos deshidrataciones propuestas en la Figura 45.

Sobre la participación de esta reacción espontánea en el mecanismo biosintético de Aldo, las evidencias acumuladas en este trabajo de Tesis (Tablas 23, 24 y 25 y Figuras 30 y 31) sugieren que, principalmente a pH 4,8, la reacción a partir de M es iniciada por la formación no enzimática de pequeñas cantidades de 18-DAL a través de alguno de los dos mecanismos antes propuestos (Figura 45), estabilizándose esta última estructura esteroide por el pH ácido. Luego, en una segunda etapa, acoplada a la primera, la 18-DAL se hidroxilaría en la posición C-18, para dar lugar, finalmente, a la Aldo.

El hecho de que esta última reacción de oxidación sea, al menos parcialmente, catalizada por una oxidasa de función mixta -tratándose por consiguiente de una hidroxilación- está comprobado por el efecto estimulador del NADP^+ y malato sobre la reacción (Tabla 26). Recientemente Kojima y col. (81) y Aupetit y col. (95) han actualizado ideas anteriores

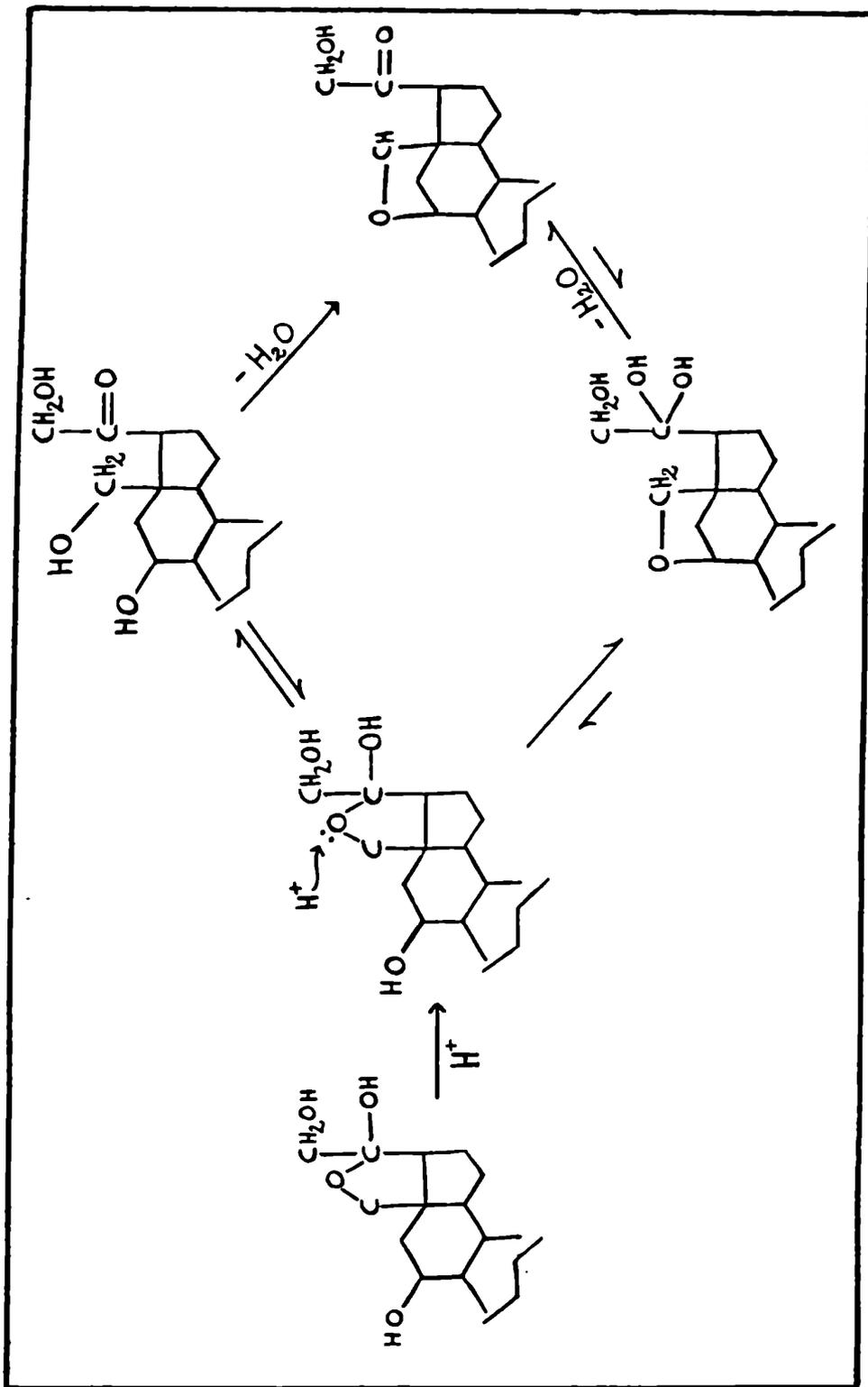


Figura 45: Mecanismos de deshidratación propuestos para la transformación de la forma M de 18-OH-B en 18-DAL.

de Marusic y col. (93) sobre mecanismos enzimáticos para la hidroxilación de 18-OH-B. A partir de los presentes resultados a pH 4,8 se sugiere que sus ideas deben ser aplicadas a la hidroxilación de 18-DAL, luego de su formación a partir de 18-OH-B.

Como se mencionó más arriba existen razones para suponer la necesidad de un medio ácido para la reacción espontánea de 18-OH-B forma M a 18-DAL. Ahora bien, ¿por qué es necesario un medio ácido para obtener alto rendimiento en la reacción de hidroxilación, una reacción enzimática que requiere poder reductor y probablemente citocromo P-450? Si la reacción general de hidroxilación ocurriera como se ha mostrado en la Figura 6, un exceso de protones debería ser crítico para no desplazar la reacción de hidroxilación hacia los reactivos. En resumen un protón sería necesario para favorecer la conversión de M a 18-DAL y un segundo protón, para la reacción de hidroxilación de 18-DAL a Aldo (Figura 46).

Comparando este último esquema propuesto (Figura 46) con el sugerido por Ulick sobre la existencia de un camino biosintéticamente activo y otro inactivo (89) (Figura 15) se puede ver que ambos están en concordancia. La pequeña diferencia entre ellos, así también como con los propuestos por Kojima y col. (81) y Aupetit y col. (95), reside en la secuencia de reacciones: en este trabajo se postula una deshidratación espontánea de 18-OH-B seguida de una hidroxilación del anhídrido, mientras que en los otros se postula la hidroxilación de 18-OH-B seguida de una deshidratación espontánea. De todos modos es necesario aclarar que los otros esquemas propuestos, si bien no son descartables al menos como vías biosintéticas alternativas, sólo se basan en la evidencia de la existencia de una hidroxilación, siendo el derivado dihidroxilado para estos autores, hipotético.

La secuencia biosintética aquí propuesta (Figura 47) encierra

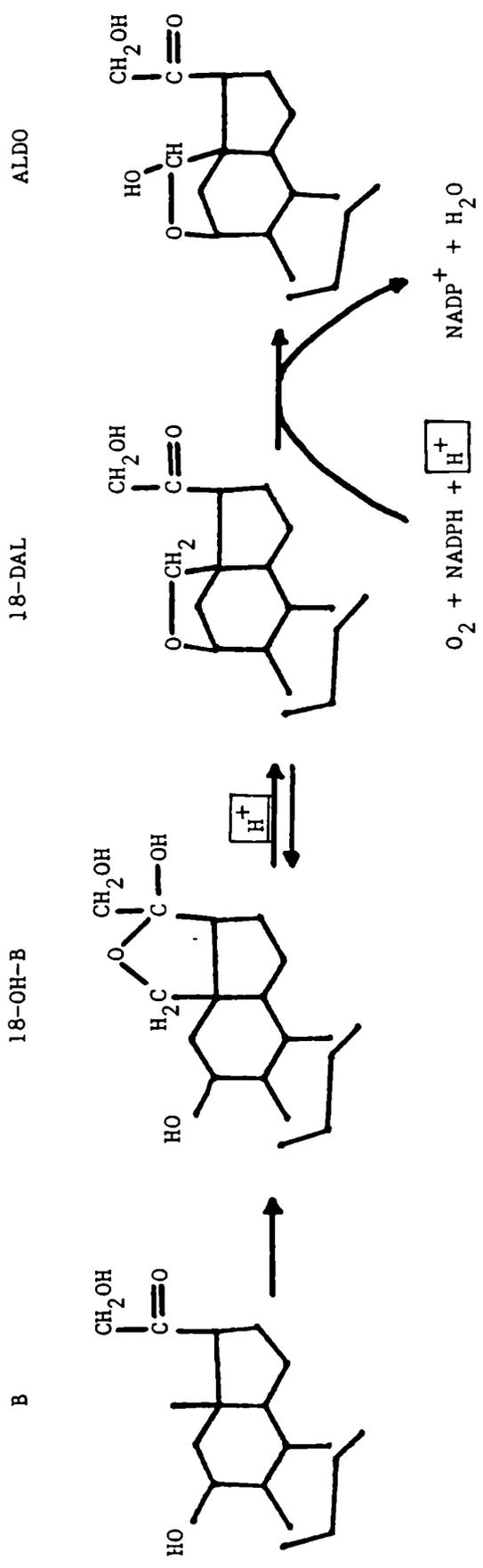


Figura 46: Pasos propuestos para la biosíntesis de Aldosterona.

la posibilidad de un sistema muy particular para la regulación de las acciones de los esteroides a nivel renal. En efecto, habiéndose comprobado que 18-OH-B actúa como eliminador de protones (9), que 18-DAL es un antisodioretentor (158) y que Aldo actúa como potente sodioretentora, se está ante un esquema integrado, en el sentido de Monod (159), donde no sólo cada eslabón y el producto final tienen funciones distintas sino que los dos últimos esteroides tienen acciones exactamente opuestas. De esta manera para cumplir con las necesidades del organismo sólo haría falta desplazar las reacciones en el sentido adecuado.

La existencia de reacciones espontáneas en los caminos biosintéticos de esteroides como la propuesta en esta Tesis para la biosíntesis de Aldo a partir de 18-OH-B, también ha sido informada por otros autores. En efecto, tal como se dijo en la Introducción, varios autores proponen para la biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos tres hidroxilaciones consecutivas en las posiciones 2, 19 y 19, seguidas de una reacción espontánea de reordenamiento que involucraría descarboxilación del C-19 y deshidrataciones, para concluir finalmente en la aromatización del anillo A del núcleo esteroideal (105) (107).

Resulta interesante efectuar una correlación entre la secuencia de reacciones aquí postulada para la biosíntesis de Aldo con la descrita para la biosíntesis de estrógenos. En ambos casos la reacción espontánea está precedida por hidroxilaciones que ocurren en dos carbonos en posición gamma y, más aún, las posiciones C-2 y C-19 para la biosíntesis de estrógenos son homólogas a las posiciones C-11 y C-18 para la biosíntesis de Aldo.

Finalizaré este título sobre precursoriedad de 18-DAL con algunas ideas acerca de relaciones entre dicha precursoriedad y la distri-

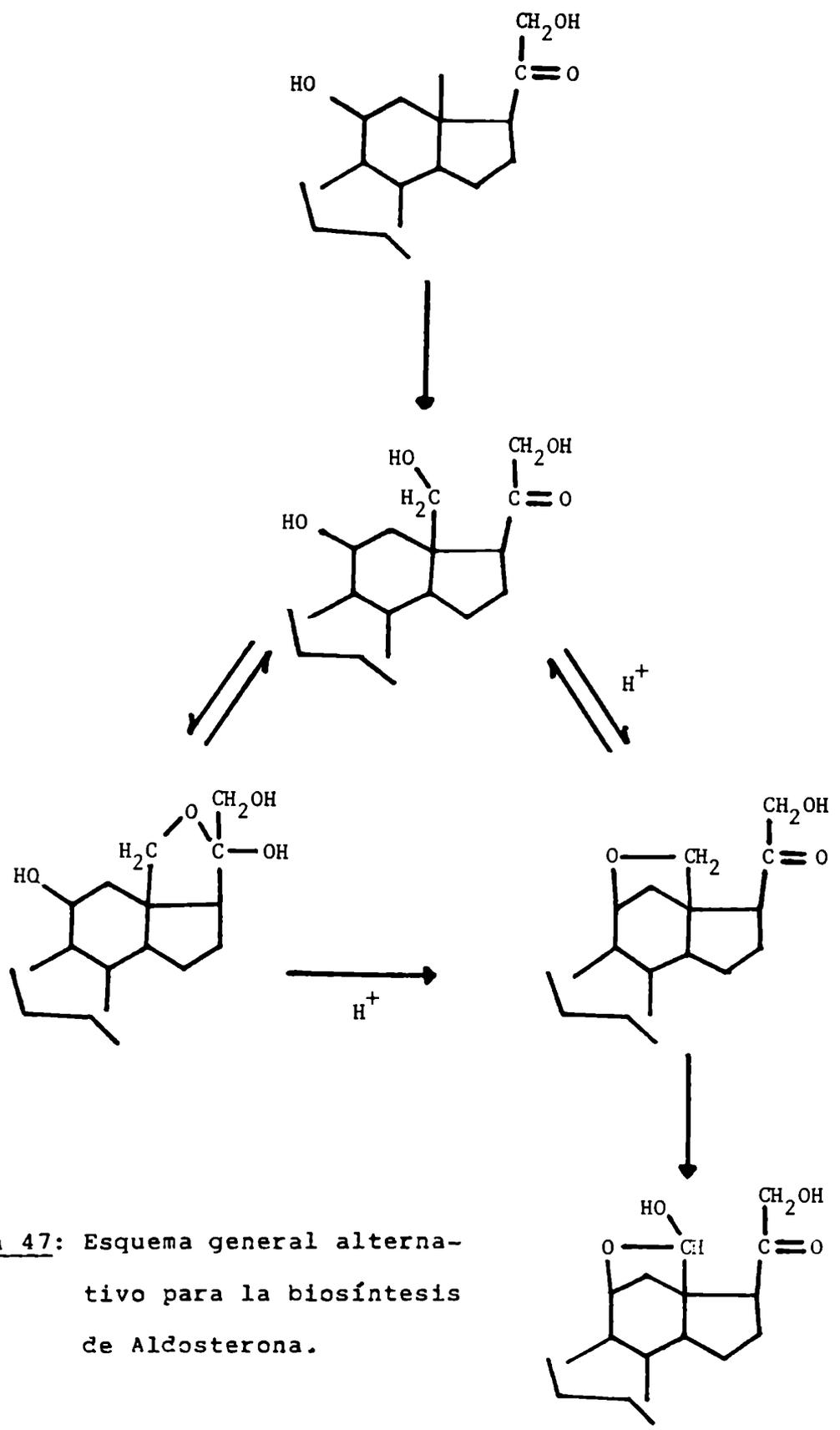


Figura 47: Esquema general alternativo para la biosíntesis de Aldosterona.

bución submitocondrial de la biosíntesis de Aldo hallada en esta Tesis.

La existencia de una zona de alta acidez se vería potenciada en el interior mitocondrial por el gradiente protónico que la Teoría quimiosmótica de Mitchell asigna a la cara externa de la membrana interna de la mitocondria. Así, podría suponerse que la 18-OH-B sea conducida intramitocondrialmente a través de caminos que, terminando en el locus de su transformación a Aldo, recorran zonas de acidez adecuada para su conversión a 18-DAL. Estas ideas sólo serían razonables suponiendo la necesidad de la integridad y en consecuencia de la coordinación del interior mitocondrial. Una primera evidencia experimental que avalaría esta suposición puede ser hallada en las incubaciones con fracciones submitocondriales donde aparte de demostrarse la biosíntesis de Aldo en las fracciones T y E, en ningún caso se recupera totalmente la actividad biosintética de la mitocondria intacta (Tabla 33). Más interesante aún es el hecho que I + X en conjunto, o sea E, ofrezcan un buen rendimiento de Aldo, pero que ninguna de estas fracciones submitocondriales por separado sean útiles a tal efecto (Tabla 33).

Precursoriedad de otras formas menos polares de 18-OH-B

Los altos rendimientos obtenidos espontáneamente a pH 3,3 con M encerrado en liposomas (pH 3,3 - línea N) y los más cuestionables con incubaciones de M libre a este pH (pH 3,3 - línea D) son notables (Tabla 13). Sin embargo no sólo sus significados biológicos sino también sus mecanismos permanecen oscuros. En primer lugar, ¿ por qué, a este, pH, es M un mejor precursor que MAC ? Una respuesta parcial a esta pre-

gunta, al menos respecto de " pH 3,3 - línea D ", puede ser encontrada en resultados no mostrados aquí. Estos resultados indican que M en medio ácido, aún después de cortos intervalos de tiempo, es intensamente convertida en 18-DAL, incrementándose esta conversión a medida que el pH del medio decrece, mientras la 18-DAL agregada exógenamente es más estable a pH 4,8. A un nivel de pH más ácido este éter es espontáneamente transformado en las fracciones aún menos polares R_M 5,26; R_M 6,33 y R_M 7,18 descritas por Aragonés y col. (6); como se demostró en esta Tesis, ninguna de esas fracciones es buena precursora de Aldo (Tabla 28). Es entonces tentador especular que la biosíntesis de niveles óptimos de Aldo depende en gran medida de la dinámica de migración de 18-OH-B dentro de la célula: si el precursor M migra a través de las porciones ácidas de la célula (pH 4,8) a una velocidad adecuada, será espontáneamente convertida en 18-DAL. Si este éter es "visto" en el momento adecuado por la segunda 18-hidroxilasa (la segunda 18-metil-oxidasa (85)) entonces la biosíntesis de Aldo será óptima. En cambio, si el medio ácido continúa y la segunda 18-hidroxilasa no actúa, entonces 18-DAL sería transformada a otras formas aún menos polares antes mencionadas.

A este respecto resultaría muy interesante estudiar la estructura, la biosíntesis, pero sobre todo la función biológica de la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 6,33 ya que bajo condiciones de pH 3,3 se produce en gran cantidad (Tabla 18).

Las ideas expuestas en lo que antecede explican la buena precursoriedad de M " pH 3,3 - línea D ", o sea transformación enzimática de 18-OH-B libre a Aldo, pero aún no explican los buenos rendimien-

tos de Aldo alcanzados espontáneamente cuando el mismo precursor se halla envuelto en liposomas de adrenales (" pH 3,3 - línea N ") (Tabla 13).

Es posible que, bajo estas condiciones, la forma M de 18-OH-B pudiera interactuar con lípidos (membrana?) de la célula adrenal. Es notable a este respecto que los esteroides encerrados en liposomas de lípidos no adrenales no poseen propiedades precursoras. Las interacciones entre 18-OH-B y liposomas adrenales podrían bien ser del tipo 20-alquilo encontrado por Aragonés y col. (6). Estos autores describen cómo esta esterificación es catalizada por trazas de ácido. Ver también Usa y col. (75).

Por qué este mecanismo espontáneo lleva también a altos rendimientos de Aldo como aquéllos informados en " pH 3,3 - línea N " (Tabla 13) es aún desconocido.

No obstante es digno de señalar que se está en presencia de una catálisis física de superficie que podría " emular " todo lo que hace un sistema enzimático: la síntesis de cantidades relativamente importantes de Aldo a partir de 18-OH-B. Los liposomas han sido objeto últimamente de una gran cantidad de publicaciones (160) (161) en las cuales se pone énfasis en sus propiedades terapéuticas (" targeting " de drogas), y aún en sus propiedades industriales (catálisis útil en síntesis orgánica). Pero no ha sido mencionado a mi conocimiento la posibilidad de que un liposoma natural pueda catalizar reacciones generalmente consideradas " bioquímicas ", reemplazando, en ese aspecto, a una enzima.

Ya en 1964 Pasqualini (162) demostró que tejidos corticoadrenales, así también como un tumor adrenal, obtenidos de un paciente con síndrome

de Conn era capaz de convertir 18-OH-B tritiada a Aldo. El autor incubó homogenatos de estos tejidos suplementados por NAD^+ y fumarato a pH 7,4. La recuperación de Aldo a partir de estos incubados, aunque menor que la obtenida en este trabajo de Tesis a pH 4,8 con 18-DAL en presencia de NADP^+ y malato, son sin embargo notables y sería de interés estudiar el efecto de preparaciones patológicas similares sobre la estructura de 18-OH-B. ¿ Podrían estos tejidos estabilizar alguna de las formas precursoras poco polares descritas o alguna otra forma menos polar de 18-OH-B, que también posea propiedades precursoras ?

Más allá del mero campo especulativo para la elaboración de hipótesis quedan estos datos experimentales de pH 3,3 que para su entendimiento global necesitan, quizás, de nuevos experimentos y/o de la aplicación de nuevas técnicas experimentales.

Nuevos compuestos no precursores

Además de 18-DAL se describen en la presente Tesis otros nuevos metabolitos de 18-OH-B: la FMPA y MS.

Todos estos compuestos tienen en común con los anteriores la característica de ser, ellos también, menos polares que los esteroides que les dan origen.

Para la FMPA no se ha podido demostrar aún un rol bioquímico, postulándose que siempre se halla en equilibrio químico con su forma monomérica (Figura 26). De todas maneras su descripción química permite predecir la necesidad de tenerla en cuenta en las cuantificaciones de Aldo.

Bajo estas consideraciones se podría enunciar que uno de los papeles de las formas menos polares de los esteroides formadas espontáneamente (al menos " in vitro "), podría ser el de permitir el pasaje a través de membranas (plasmáticas, mitocondriales o nucleares). Sobre este aspecto llama la atención que aparentemente la Aldo colocada en presencia de células blanco tarda menos tiempo que otros esteroides de menor polaridad, y por lo tanto más lipofílicos, y en consecuencia con mayor facilidad para atravesar membranas, en llegar al núcleo (163).

En este mismo sentido vale la pena destacar que aparte de las organelas acídicas mencionadas en la Sección Resultados es bastante generalizada la suposición de que en una capa relativamente delgada justo adyacente a las membranas, existe una alta acidez. Sobre esta base, y ya en el terreno de la especulación sería dable suponer que siendo la Aldo un componente altamente polar deba " adoptar " una estructura de menor polaridad para atravesar las membranas intracelulares, encontrándose justo en estas últimas con las condiciones para adoptar aquellas estructuras. Podrá ser la FMPA esta estructura ?

Una hipótesis similar podría enunciarse para la 18-OH-B a la cual el medio ácido adyacente a las membranas transformaría en 18-DAL y/u otros compuestos pocos polares de buena precursoriedad. (Véase también todo lo expuesto al respecto en los dos títulos anteriores). Se superpondrían entonces dos propiedades adquiridas en el medio ácido que hacen a la buena precursoriedad: a) configuraciones moleculares adecuadas; b) alta liposolubilidad que facilita el transporte a través de membranas.

Acerca de MS en particular, a la luz de los resultados aquí presentados (Tabla 29 y 30) puede decirse que es un producto metabólico de 18-OH-B, que necesita revertir a 18-OH-B para dar Aldo, y que podría ser un compuesto de reserva frente a las necesidades biosintéticas de la célula, y las fisiológicas del organismo.

Apoyando ésto último resultan interesantes los hallazgos preliminares obtenidos con ACTH. Ellos indicarían que los niveles de 18-OH-B, y por ende de 18-DAL, estarían influenciados por dos rutas de metabolización: una que forma MS el cual puede revertir al esteroide original (Tablas 29 y 30) y otra que produce irreversiblemente Aldo. A su vez, según los estudios previos de regulación llevados a cabo en esta Tesis, estas vías serían activadas o inhibidas por ACTH, en una forma dependiente de la concentración de la trofina, resultando efectos opuestos sobre ambos metabolitos (Tabla 35 y Figuras 39, 40, 41 y 42).

Es de hacer notar que aquí no se abre juicio sobre la naturaleza fisiológica o farmacológica de las altas concentraciones de ACTH sino que se utiliza este efecto bimodal de la trofina (22) como modelo para estudiar relaciones MS-Aldo.

Distribución submitocondrial e ideas finales

A nivel submitocondrial se ha visto que en presencia de NADPH las fracciones T y E biosintetizan Aldo a partir de B, mientras que con malato y NADP^+ sólo lo hace T (Tabla 33). Este resultado es lógico ya que en E no se hallan ni la enzima málica ni el ciclo de Krebs.

De esta forma podría postularse que B o se transforma en Aldo en T

(existiendo en T entonces las dos 18-hidroxilasas) o se transforma en Aldo en E para lo cual hay que aceptar que las dos 18-hidroxilasas se hallan separadas en las fracciones X e I. La 18-OH-B generada en E, o quizás también proveniente de T, debería optar entonces entre oxidarse a Aldo o " acumularse " como MS, como reserva.

De los hallazgos de esta Tesis surge que existen diferentes vías, modos y condiciones conducentes a la biosíntesis de Aldo ya sea secuencial o alternativamente. Este hecho no nos debe sorprender dada la complejidad de la regulación del equilibrio electrolítico a través de mineralocorticoides, hormonas éstas que, en vista de su imprescindibilidad para el organismo, no deben hallarse limitadas a un sólo camino de biosíntesis enzimática. Es en este contexto que hay que entender desde un punto de vista biológico la multiplicidad y heterogeneidad molecular de las posibilidades de transformación de 18-OH-B a Aldo. Tampoco se pueden excluir posibilidades de biosíntesis de Aldo que obvian a la 18-OH-B y aún a B tales como los descritos por Muller (27) y Vinson y Whitehouse (91). El esquema de la Figura 13 es particularmente interesante para generalizar posibilidades de biosíntesis de esta naturaleza.

C O N C L U S I O N E S

En el presente trabajo de Tesis se han encontrado en las incubaciones de 18-OH-B los siguientes metabolitos: 1) Las formas menos polares de 18-OH-B previamente obtenidas por suspensión de este esteroide en medio ácido (6). Estos metabolitos forman parte de la fracción denominada MAC en esta Tesis.

2) MS

3) FMPA, también obtenida en esta tesis al suspender Aldo en HCl.

Para estos metabolitos se han podido realizar las siguientes caracterizaciones estructurales: 1) Se confirmó que el principal componente del MAC era la forma menos polar de 18-OH-B de R_M 4,33 (6). Se demostró por RMN que dicho material consistía en 18-DAL. Para las otras formas menos polares de 18-OH-B : R_M 5,26; R_M 6,33 y R_M 7,18, se efectuaron caracterizaciones químicas tales como sus estabilidades en residuo seco y en medio amoniacal (Tabla 5).

2) Para MS se propone una estructura de un éster de 18-OH-B.

3) Para la FMPA se demostró la estructura de un dímero (Figura 26).

Se han podido asignar las siguientes propiedades bioquímicas: 1) Para 18-DAL se demostró que es intermediario en la biosíntesis de Aldo a partir de B y de 18-OH-B en , al menos, una de las vías biosintéticas del mineralocorticoide. Se demostró que la oxidación de 18-DAL a Aldo consiste en una hidroxilación. También se ha demostrado buena capacidad precursora para Aldo de algunas preparaciones de M (Tabla 13), aunque no estamos seguros de su importancia biológica. Sin embargo para una de aque-

llas condiciones, la que se refiere a la conversión espontánea a Aldo de M incorporada a liposomas, se demostró la especificidad para liposomas preparados a partir de lípidos de glándulas adrenales.

2) Para MS se postula una función de reserva de 18-OH-B: las diversas concentraciones de ACTH regulan su concentración en forma simétricamente opuesta a la Aldo (Tabla 35 y Figuras 39, 40, 41 y 42).

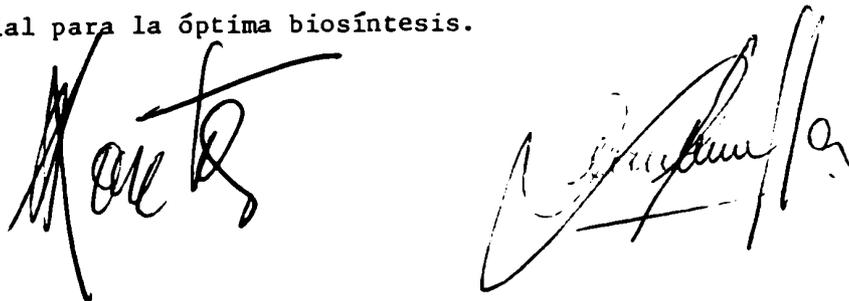
La naturaleza de la reacción de obtención de los metabolitos mencionados es la siguiente: 1) 18-DAL, espontánea y enzimática.

2) MS, sólo enzimática.

3) FMPA, sólo espontánea. Este dímero se halla en equilibrio con Aldo. Por lo tanto es importante tenerlo en cuenta para los dosajes de Aldo.

La localización subcelular de las biosíntesis de Aldo y MS se halló en Mitocondrias.

La localización submitocondrial de la biosíntesis de Aldo se halló en Mitoplastos (con malato + NADP^+ y NADPH) y en la membrana externa + espacio intermembrana, fracción E (sólo con NADPH) siendo cuantitativamente más importante el primer lugar de biosíntesis mencionado. Bajo ninguna condición de incubación se recupera la actividad biosintética mitocondrial. Por consiguiente se postula la necesidad de la integridad mitocondrial para la óptima biosíntesis.



B I B L I O G R A F I A .

R E F E R E N C I A S

- 1) Borrue! M.: Efecto de la Adrenalina sobre la corticoidogénesis. Tesis de Doctorado en Medicina. Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (1970).
- 2) Damasco M.C.: Acción Bioquímica y biológica de la 18-hidroxycorticosterona. Tesis de Doctorado en Medicina. Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (1981).
- 3) Aragonés A.: Estudios estructurales y bioquímicos sobre C-21 esteroides 18-hidroxilados. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. (1978).
- 4) Borrue! M.; Borrue! P.; Damasco M. C. y Lantos C.P.: Gen. Comp. Endocr. 22 (1974) 1-12.
- 5) Damasco M. C. y Lantos C. P.: J. Steroid. Biochem. 6 (1975) 69-74.
- 6) Aragonés A.; Gros E. G.; Lantos C. P. y Locascio G.: J. Steroid. Biochem. 9 (1978) 175-180.
- 7) Aragonés A.; Lantos C. P. y Locascio G.: Acta Physiol. lat. amer. 26 (1976) 277-282.
- 8) Damasco M.C.; Díaz F.; Ceñal J. P. y Lantos C. P.: Acta physiol. latinoam. 29 (1979) 305-314.

- 9) Damasco M. C.; Vallverdú R.; Ceñal J. P.; Otero de Bedners M. E. y Lantos C. P.: Acta physiol. latinoam. 33 (1983) 283-291.
- 10) Damasco M. C. y Malnic G.: Enviado para su publicación al Mineral and Electrolyte Metabolism.
- 11) Fraser R. y Lantos C. P.: J. steroid Biochem. 9 (1978) 273-286.
- 12) Damasco M. C. y Malnic G.: Acción de esteroides adrenales sobre la Acidificación tubular distal. Comunicación a la XXX Reunión de la SAIC (1985).
- 13) Lantos C. P.; Burton G.; Roldán A.; Damasco M. C.; Aragonés A.: Progress in Clinical and Biological Research. Editores: R. J. Soto; A. de Nicola y J. Blaquier. Alan R. Liss, Inc., New York (1981), Vol. 74, 477-494.
- 14) Kondo E.; Mitsugi T. y Tori K.: J. Am. chem Soc. 87 (1965) 4655-4656.
- 15) Roy A. K.; Ramírez L. C. y Ulick S.: J. steroid Biochem. 7 (1976) 81-87.
- 16) Birmingham M. K. y Ward P. J.: J. biol. chem. 236 (1961) 1661-1667.
- 17) Schmidlin J. y Wettstein A.: Helv. chim. Acta 44 (1961) 1596-1607.

- 18) Arison B. H.; Chu M. D. y Ulick S.: J. steroid Biochem. 17 (1982) 467-469.
- 19) Cozza E. N.; Burton G.; Ceballos N.; Lantos C. P.; Harnik M. y Scott I.: J. steroid. Biochem. 22 (1985) 665-672.
- 20) Genard P.: Org. mag. Res. 11 (1978) 478-480.
- 21) Ulick S.; Gautier K. K.; Vetter J. R.; Markello R.; Yaffe S. y Lowe C.: J. clin. Endocr. 24 (1964) 669-672.
- 22) Lantos C. P.: Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues. Editores K. Fotherby y S. B. Pal. Walter de Gruyter, Berlín (1981) Volumen 2, 131-163.
- 23) Bruchovsky N. y Wilson J. D.: J. biol. Chem. 243 (1968) 2012-2021.
- 24) Farnesil D. D. y Edelman I. S.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56 (1966) 872-879.
- 25) Purvis J. L.; Battu R. G. y Péron F. G.: Functions of the adrenal cortex. Editor: K. W. McKerns. Appleton-Century-Crofts, Division of Meredith Corporation (1968), Volumen 2, 1007-1055.
- 26) Guerra F.; Péron F. G. y McCarthy J. L.: Biochim. Biophys. Acta 117 (1966) 433-449.

- 27) Harding B. W.; Wilson L. D.; Wong S. H. y Nelson D. H.: Steroids Suppl. 2 (1965) 51-77.
- 28) Grant J. K. y Brownie A. C.: Biochim. Biophys. Acta 18 (1955) 433-434.
- 29) Cammer W. y Estabrook R. W.: Fed. Proc. 25 (1966) 281-287.
- 30) Watanuki M.; Tilley B. E. y Hall P. F.: Biochim. Biophys. Acta 483 (1977) 236-247.
- 31) Bjorkhem I. y Karlman K.: Eur. J. Biochem. 51 (1975) 145-154.
- 32) Thompson E. A. y Siiteri P. K.: J. biol. chem. 249 (1974) 5373-5378.
- 33) Rapp J. P. y Dahl L. K.: Biochemistry 15 (1976) 1235-1242.
- 34) Okamoto M.; Momoi K.; Fujii S. y Yamano T.: Biochem. biophys. Res. Commun. 109 (1982) 236-241.
- 35) Momoi K.; Okamoto M.; Fujii S.; Kim C. Y.; Miyake Y. y Yamano T.: J. biol chem. 258 (1983) 8855-8860.
- 36) Mitani F.; Shimizu T.; Veno R.; Ishimura Y.; Izumi S.; Komatsu N. y Watanabe K.: J. Histochem. Cytochem. 30 (1982) 1066- 1074.

- 37) Jefcoate C. R.; Orme-Johnson W. H. y Beinert H.: J. biol. Chem. 251 (1976) 3706-3715.
- 38) Shikita M. y Hall P. F.: J. biol. Chem. 248 (1973) 5598-5604.
- 39) Ryan R. J. y Engel L. L.: J. biol. Chem. 225 (1957) 103-106.
- 40) Estabrook R. W.; Cooper D. Y. y Rosenthal O.: Biochem. Z. 338 (1963) 741-746.
- 41) Omura T. y SAto R.: J. biol. Chem. 239 (1964) 2370-2378.
- 42) Nakajin S. y Hall P. F.: J. biol. chem. 256 (1981) 3871-3876.
- 43) Nakajin S. y Hall P. F.: J. steroid Biochem. 19 (1983) 1345-1348.
- 44) Boguslawski W.: J. steroid Biochem. 18 (1983) 771-775.
- 45) Shaw D.A.; Dalziel E. M. y O'Donnell V. J.: Biochem. J. 113 (1969) 737-739.
- 46) Canick J. A. y Ryan K. J.: Molec. cell Endocr. 6 (1976) 105-115.
- 47) Yagi J.; Sugiyama T.; Okamoto M.; Kurachi K. y Yamano T.: J. steroid Biochem. 18 (1983) 707-713.
- 48) Watanuki M.; Tilley B. E. y Hall P. F.: Biochemistry 17 (1978) 127-130.

- 49) Momoi K.; Okamoto M. y Yamano T.: J. steroid Biochem. 22 (1985) 267-271.
- 50) Narasimhulu S.; Cooper D. Y. y Rosenthal O.: Abstracts of 140th Meeting of the American Chemical Society, 63C, No 153 (1961).
- 51) Schenkman J. B.; Remmer H. y Estabrook R. W.: Molec. Pharm. 3 (1967) 113-123.
- 52) Narasimhulu S.; Cooper D. Y. y Rosenthal O.: Life Sci. 4 (1965) 2101-2107.
- 53) Cooper D. Y.; Narasimhulu S.; Rosenthal O. y Estabrook R. W.: Functions of the adrenal cortex. Editor: K. W. McKerns. Appleton-Century-Crofts, Division of Meredith Corporation (1968), Volumen 2, 897-942.
- 54) Hales D. B. y Betz G.: J. steroid Biochem. 21 (1984) 639-642.
- 55) Hildebrant A.; Remmer H.; Estabrook R. W.: Biochem. biophys Res. Commun. 30 (1968) 607-612.
- 56) Peterson J. A.: Archs. biochem. Biophys. 144 (1971) 678-693.
- 57) Hales D.; Betz G.: J. steroid Biochem. 21(1984) 639-642.
- 58) Zachariah P. K.; Lee Q. P.; Symms K. G.; Juchau M. R.: Biochem. Pharmac. 25 (1976) 793-800.

- 59) Mason H. S.: *Advances Enzyme* 19 (1957) 79.
- 60) Rosenthal O. y Narasimhulu S.: *Meth. Enzymol.* 15
(1969) 614-620.
- 61) Rosenthal O. y Narasimhulu S.: *Meth. Enzymol.* 15 (1969)
622-624.
- 62) Levy H.; Jeanloz R. W.; Jacobsen R. P.; Hechter O.;
Schenker V. y Pincus G.: *J. biol. Chem.* 211 (1954)
867-881.
- 63) Rosner J.; Hall P. F. y Eik-Nes K. B.: *Steroids* 5
(1965) 199-210.
- 64) Schmidlin J.; Wettstein A.: *Helv. chim. Acta* 44 (1961)
1596-1607.
- 65) Prost M.; Maume B. F.: *J. steroid Biochem.* 5 (1974)
133-144.
- 66) Péron F. G.: *Endocrinology* 66 (1960) 458-469.
- 67) Shackleton C. H. L.; Honour J. W.: *J. steroid Biochem.*
8 (1977) 199-203.
- 68) Péron F. G.: *Endocrinology* 69 (1961) 39-45.
- 69) Kahnt F. W.; Neher R.; Wettstein A.: *Helv. chim. Acta*
38 (1955) 1237-1248.
- 70) Génard P.; Palem Vlies M.; Denoel C.; van Cauwenberge
H.; Eechaute D.: *J. steroid Biochem* 6 (1975) 201-210.

- 71) Domínguez O.: Steroids 6 (Suppl. 2) (1965) 29-49.
- 72) Kirk D.: In Instructions from the Medical Research Council Steroid Reference Collection.
- 73) Bush I. E.: Biochem. J. 50 (1952) 370-378.
- 74) Sandor T. y Lanthier A.: Acta endocr. Copenh. 42 (1963) 355-363.
- 75) Usa T.; Ganguly A. y Weinberger M. H.: J. steroid Biochem. 10 (1979) 557-562.
- 76) Levi H.; Cargill D. T.; Chung H. C.; Hood B. y Carlo J. J.: Steroids 5 (1965) 131-146.
- 77) De Vries C. P. y De Jong P. J. M.: J. steroid Biochem. 13 (1980) 387-394.
- 78) Cozza E. N.; Lantos C. P. y Burton G.: J. steroid Biochem. 23 (1985) 511-516.
- 79) Nicolis G. L. y Ulick S.: Endocrinology 76 (1965) 514-521.
- 80) Vecsei P.; Lommer D. y Wolff H. P.: Experientia 24 (1968) 1199-1201.
- 81) Kojima I.; Inano H. y Tamaoki B. I.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 106 (1982) 617-625.
- 82) Kojima I.; Ogata E.; Inano H. y Tamaoki B.: Acta Endocr. 107 (1984) 395-400.

- 83) Müller J.: J. steroid Biochem. 13 (1980) 245-251.
- 84) Neher R.: J. Endocr. 81 (1979) 25P - 35P.
- 85) Ulick S.: Proc. Fourth Int. Congress Endocrin. American Elsevier Publishing Co; New York (1973), 761-767.
- 86) Müller J.: Regulation of Aldosterone Biosynthesis Springer-Verlag, Heidelberg (1971).
- 87) Raman P. B.; Sharma D. C. y Dorfman R. I.: Biochemistry 5 (1966) 1795-1804.
- 88) Aupetit B.; Aubry-Marais F. y Legrand J. C.: Biochimie 59 (1977) 311-321.
- 89) Ulick S.: J. clin. Endocr. Metab. 43 (1976) 92-96.
- 90) Hochberg R. B.; McDonald P. D. y Lieberman S.: Proc. Fourth Int. Congr. Endocrinol. American Elsevier Publishing Co. New York (1973), 801-807.
- 91) Vinson G. P. y Whitehouse B.: Acta endocr. 72 (1973) 52-76.
- 92) Greengard P.; Psychoyos S.; Tallan H. H.; Cooper D. Y.; Rosenthal O. y Estabrook R. W.: Arch. Biochem. 121 (1967) 298-302.
- 93) Marusic E. T.; White A. y Aedo A. R.: Archs. Biochim. Biophys. 157 (1973) 320-321.

- 94) Aupetit B.; Toury R. y Legrand J. C.: *Biochimie* 62 (1980) 823-827.
- 95) Aupetit B.; Accarie Ch.; Emeric N.; Vonrax V. y Legrand J. C.: *Biochim. biophys. Acta* 752 (1983) 73-78.
- 96) Psychoyos S.: Tallan H. H. y Greengard P.: *J. biol. chem.* 241 (1966) 2949-2956.
- 97) Aupetit B.; Antreassian J. y Legrand J. C.: *Biochimie* 59 (1977) 705-712.
- 98) Giroud C. J. P.; Stachenko J. y Venning E. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92 (1956) 154.
- 99) Stachenko J. y Giroud C.J. P.: *Endocrinology* 64 (1959) 730.
- 100) Lucis O. J.; Dyrenfurth I. y Venning E. H.: *Canad. J. Biochem.* 39 (1961) 901.
- 101) Ward P. y Birmingham J. K.: *Acta Endocr. (Kbh)* 39 (1962) 110.
- 102) Sheppard H.; Swenson R. y Mowles T. F.: *Endocrinology* 73 (1963) 819-824.
- 103) De Nicola A. F. y Dahl V.: *Endocrinology* 89 (1971) 1236-1241.

- 104) Fishman J. y Raju M. S.: J. biol. Chem. 256 (1981)
4472-4477.
- 105) Hahn E. F. y Fishman J.: J. biol. Chem. 259 (1984)
1689-1694.
- 106) Thompson E. A. Jr. y Siitieri P. K.: J. biol. Chem.
249 (1974) 5364-5372.
- 107) Akhtar M.; Calder M. R.; Corina D. L. y Wright J. N.:
Biochem. J. 201 (1982) 569-580.
- 108) Garren L. D.; Gill G. N.; Masvi H. y Walton G. M.:
Rec. Prog. Horm. Res. 27 (1971) 433.
- 109) Mc Kerns K. W.: Biochim. Biophys. Acta 90 (1964)
357-371.
- 110) De Nicola A. F. y Lantos C. P.: Endocrinología Mo-
lecular. Coordinadores: R. S. Calandra y A. F. De
Nicola. El Ateneo, Buenos Aires (1980). 109-120.
- 111) Podestá E. J.: Endocrinología Molecular. Coordinado-
res: R. S. Calandra y A. F. De Nicola. El Ateneo,
- 112) Aguilera G. y Catt K. J.: Endocrinology 104 (1979)
1046-1052.
- 113) Haning R.; Tait S. A. S. y Tait J. F.: Endocrinology
87 (1970) 1147-1153.

- 114) Venning E. H.; Dyrenfurth I. y Beck J. C.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 16 (1956) 1541-1546.
- 115) Kaplan N. M. y Bartter F. C.: J. Clin. Invest. 41 (1962) 715-719.
- 116) Douglas J.; Aguilera G.; Kondo T. y Catt K.: Endocrinology 97 (1975) 1577-1584.
- 117) Lantos C. P.; Birmingham M. K. y Traikov H.: Acta physiol. lat. amer. 17 (1967) 42-54.
- 118) Lantos C. P.; Dahl V.; Cordero Funes J. R. y De Nicola A. F.: Acta physiol. lat. amer. 23 (1973) 277-287.
- 119) De Nicola A. F.; Dahl V. y Kaplan S.: J. steroid. Biochem. 4 (1973) 205-215.
- 120) Müller J.: Endocrinology 103 (1978) 2061-2068.
- 121) Aguilera G.; Fujita K. y Catt K. J.: Endocrinology 108 (1981) 522-528.
- 122) Forsham P. H.: Textbook of Endocrinology. Editor: R. H. Willams W. B. Founder, Philadelphia (1962) 282-394.
- 123) Podestá E. J.: Protein Phosphorylation and Bio-Regulation. Editores: G. Thomas; E. J. Podestá y J. Gordon. FMI-EMBO Workshop, Basel (1979) 48-60.
- 124) John M. E.; Boggaram V.; John M. C.; Simpson E. R. y Waterman M. R.: International Congress of Biochemistry (1985)

- 125) Williams G.H.; Mc Donnell L. M.; Tait S. A. S. y
Tait J. F.: *Endocrinology* 91 (1972) 948-960.
- 126) Baumann K. y Müller J.: *Acta endocr. Copenh.* 76(1974)
102-116.
- 127) Cozza E. N.; González, C. B.; Ceballos N. R.; Aragonés
A.; Lenza R. y Lantos C. P.: *Anal. Asoc. Quím. Arg.*
71 (1983) 509- 521.
- 128) Kliman B. y Peterson R. E.: *J. biol. Chem.* 235 (1960)
1639-1648.
- 129) Horning E. C. y Maume B. T.: *J. chromatogr. Sci.* 7
(1969) 411-418.
- 130) Knox J. H. y Pryde A.: *J. Chromatogr.* 112 (1975) 171.
- 131) Wikby A.; Thalén A. y Oresten G.: *J. Chromatogr.* 157
(1978) 65.
- 132) Burgess G.: *J. Chromatogr.* 149 (1978) 233.
- 133) Bristow P.: *Liquid Chromatography in practice*, HEPT,
Wilmslow, 1977.
- 134) Laird G. R.; Jurand J. y Knox J. H.: *Proc. Soc. Anal.*
Chem. 172 (1974) 310.
- 135) Morris D. J. y Tsai R.: *Advances in Chromatography*,
Vol. 19, 481. Editado por J. C. Giddings (1980).
- 136) Cozza E. N. y Fasoli H.: *Comunicación Nº 32 del XVI*
Congreso Argentino de Química, Córdoba, Argentina.

- 137) Cherkin A.; Martínez F. y Dunn M.; J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 1244-1245.
- 138) Saffran M. y Shally V.: Endocrinology 56 (1955) 523.
- 139) Bush I. E. y Willoughby M.: Biochem. J. 67 (1957) 689-700.
- 140) Neher R.: Steroid chromatography. Elsevier, Amsterdam (1964).
- 141) Liquid Scintillation Counting. Editado por E. D. Bransome. Grune Stratton, New York, 1970.
- 142) Pigni N. J.; Gigena C. J. y Lantos C. P.: J. steroid Biochem. 5 (1974) 525-526.
- 143) Possmayer F. y Yu S. H.: International Congress of Biochemistry (1985) Amsterdam, res. com. lib. TU-473.
- 144) Bronfman M.: Orellana A. y Morales M. N.: International Congress of Biochemistry (1985) Amsterdam, res. com. lib. TU-319.
- 145) Abramson M. B.; Katzmann R. y Gregor H. P.: J. Biol. Chem. 239 (1964) 70-76.
- 146) Saunders L.; Perrin J. y Gammack D. B.: J. Pharm. Pharmacol. 14 (1962) 567-572.
- 147) Ceballos N. R.: Cozza E. N. y Lantos C. P.: Gen Comp. Endocrinol. 51 (1983) 138-147.

- 148) Pennington R. J.: *Biochem. J.* 80 (1961) 649-654.
- 149) Lowry O.; Rosebrough N.; Farr A. y Randall R.: *J. biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- 150) Schnaitman C. A.; Erwin V. G. y Greenwalt J. W.: *J. Cell Biol.* 32 (1967) 719-727.
- 151) Johnston J. P.: *Biochem. Pharmacol.* 17 (1968) 1285-1297.
- 152) Schnaitman C. a. y Greenwalt J. W.: *J. Cell Biol.* 38 (1968) 158-175.
- 153) Reijngoud D. J. y Tager J. M.: *Biochim. biophys. Acta* 472 (1977) 419-449.
- 154) Jensen M. S. y Bainton D. F.: *J. Cell Biol.* 56 (1973) 379-388.
- 155) Xiao-Song Xie; Stone D. K. y Racker E.: *J. biol. Chem.* 258 (1983) 14834-14838.
- 156) Renswoude J. V.; Bridges K. R.; Harford J. B. y Klausner R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6186-6190.
- 157) Mitchell P. y Moyle J.: *Eur. J. Biochem.* 7 (1969) 471-484.
- 158) Ulick S.; Marver D.; Adam W. R. y Funder J. W.: *Endocrinology* 104 (1979) 1352-1356.

- 159) Monod: Endocrinology 78 (1966) 412-425.
- 160) Shu-Sen L.: International Congress of Biochemistry
(1985) Amsterdam. res. com. lib. TU-374.
- 161) Huang L.: International Congress of Biochemistry
(1985) Amsterdam. res. com. lib. TU-370.
- 162) Pasqualini J. R.: Nature 201 (1964) 501.
- 163) Coirini H.: Naturaleza y Regulación del Receptor
de Mineralocorticoides en el Sistema Nervioso
Central. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, U.B.A. (1984).

|
|
|
|