

Tesis de Posgrado

Regulación de la respuesta adrenal : Acción y mecanismo de acción de adrenocorticotrofina y endotelina

Pecci, Adali

1994

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:

Pecci, Adali. (1994). Regulación de la respuesta adrenal : Acción y mecanismo de acción de adrenocorticotrofina y endotelina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2635_Pecci.pdf

Cita tipo Chicago:

Pecci, Adali. "Regulación de la respuesta adrenal : Acción y mecanismo de acción de adrenocorticotrofina y endotelina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2635_Pecci.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Regulación de la Respuesta
Adrenal:
Acción y Mecanismo de Acción de
Adrenocorticotrofina y Endotelina**

Autor:
Adali Pecci

Director de Tesis:
Eduardo Néstor Cozza

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

-1994-

yz

a Felipe y Ernesto

Agradezco,

al Dr. Eduardo Cozza como director, por aceptar el desafío con entusiasmo y excesiva responsabilidad, fomentando el “pensar en voz alta”, por el estímulo constante. Porque valió la pena la espera.

A Eduardo como compañero, por haber depositado su total confianza en mí, por el trabajo codo a codo, por todos sus consejos.

al Dr. Carlos P. Lantos, por enseñarnos a pensar en forma integrativa, por fomentar el trabajo multidisciplinario y por haberse convencido de que la Química Fisiológica es un tema de mi interés.

a mis compañeros del laboratorio 1.300.001, Laura, Damián y Carolina por haber terminado con el orden que el Jefe y yo manteníamos en el laboratorio. A Laurita, Sandra y Pedro, por los RIAs, las infusiones y todo el tiempo dedicado.

a Beba por su excelente colaboración en los trabajos de infusión, gracias a ella esos experimentos fueron realmente *in vivo*.

a Nora, por enseñarme a trabajar en la mesada, por sus críticas constructivas y por todos sus consejos de Bruja.

a Alcira, por sus consejos, su estímulo y buena predisposición para solucionar los problemas cotidianos.

a los integrantes del laboratorio de Esteroides, por el clima de compañerismo impuesto y por comprender que el material de trabajo no se roba sino que se distribuye. A Mario, por la fuerza que irradia para seguir adelante. A los chiquitos Guille, Andrea y Julito.

a los compañeros de antaño Claudia G., Silvina, Norita y Martín.

a los compañeros de pasillo: M. del Carmen Vila (por su disposición a las consultas, sus consejos y su paciencia), Cánepa, Ceci y Elena, Juan y Silvina, Mary y Marta, Rosa, Silvia, Adriana, M. del Carmen Ríos y Carmencita, a Horacio, Ana María, Diana y Yolanda, por la terapia y la disposición para sacarme siempre del apuro. En particular a Silvia y sus chicas: Elba, Silvia y Vanina, por compartir los secretos de la transducción de señales y del RIA de cAMP.

a la Dra. Passeron y a los integrantes del laboratorio de Biología Molecular: María, Cristina, Pedro y los chiquitos, por colaborar en el equipamiento del laboratorio, contador incluido.

al Dr. Omar Pignattaro por su guía y consejos durante la puesta a punto del RIA de cAMP.

al Dr. Barassi y al personal del Bioterio Central, por cuidar muy bien a mis ratitas.

a Lili y a las chicas de la Secretaría de Química Biológica.

a Norma y a Felisa, por mantener la verdadera limpieza del laboratorio.

a los compañeros de mi laboratorio consorte, Lili, Ceci, Vivi y Hugo, por hacer que la recta final fuera mucho más agradable. En particular a Darío, por demostrar que la comunicación en el tercer mundo también es posible.

a las chicas de la Secretaría del INQUIMAE.

a Güiye G. Burgos, por su empecinada manera de imponerme rigurosidad como Co-Co-Becario y por lo especial de llevar adelante una larga amistad "sin sentimientos".

al Dr. Rodolfo Biekofsky por colaborar en la tesis de Eli.

a los amigos Darío, Rolfy, Pablo, Marcelo R., Ernesto, Elena, Laura, Carina, Marina, Omar, Ruth, Cora, Marcelo y Diego.

a la Secta de Santa Clara: Guiye, Bea y (?), Pedro, Sandra y Andrés, Juan, Claudia y Giorgia.

a las chicas de Cruz Chica Teresa y Lilian.

a Beatriz y José, por las buenas ondas.

a Susan y Sonia, porque están.

al Dr. C. E. Gómez-Sánchez por brindar gran parte de su tiempo y su material para llevar adelante este trabajo.

a la Dra. M. Flawiá, por facilitarme toxina del Cólera los ensayos *in vitro*.

al Dr. E. Charreau, por facilitarme el tracer para el RIA de cAMP.

al Dr. Descalzo de Merk Sharp and Dhome, por el Enalapril.

al Dr. Arturo Vitale, por el contador de centelleo sólido.

a GTlab. Rosario, por el Kit para medir colesterol libre.

al Dr. E. Isola, por la aminoglutetimida.

al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme brindado el espacio y el soporte económico para llevar adelante mi trabajo.

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Fundación Antorchas, a la Universidad de Buenos Aires y al NIII, por el apoyo brindado al proyecto de investigación.

a mis hermanos, por la colaboración.

a mis padres, por la oportunidad y el apoyo incondicional.

a Ernesto, mi compañero, por tirar siempre del carro para adelante.

a Felipe, por la eterna paciencia.

Contenido

1	Introducción	1
1.1	La Glándula Adrenal	3
1.2	Aldosterona	7
1.2.1	Regulación de la Biosíntesis de ALDO	12
1.2.2	Efectos Primarios y Mediación Intracelular	17
1.3	Adrenocorticotrofina	34
1.4	Endotelina	39
1.5	Objetivos	45
2	Diseño Experimental	47
2.1	Animales	48
2.2	Estudios <i>in vivo</i>	48
2.2.1	Preparación de los Animales para las Infusiones	48
2.2.2	Sustancias Infundidas: Elección de las Dosis	49
2.2.3	Protocolo de Infusión	51
2.2.4	Determinación del Hematocrito y Medición de la Presión Arterial Media	52
2.2.5	Soluciones Buffers Utilizadas	54
2.2.6	Preparación de los Homogenatos de los Distintos Tejidos	54
2.2.7	Incubaciones con la Fracción Mitocondrial	55
2.2.8	Obtención de Microsomas	57
2.2.9	Extracción de Esteroides Plasmáticos	58
2.3	Estudios <i>in vitro</i>	58
2.3.1	Soluciones Buffers Utilizadas	59
2.3.2	Drogas Ensayadas: Sus concentraciones	59

2.3.3	Preparación de Células Dispersas	62
2.3.4	Incubaciones con Células Dispersas	62
2.4	Cuantificación de Esteroides	66
2.4.1	Protocolo general del RIA de esteroides	66
2.4.2	Purificación del Marcador Radioactivo	68
2.4.3	Determinación del Título del Anticuerpo	69
2.4.4	Verificación por HPLC de la Información Obtenida por RIA	72
2.5	Determinación de los Niveles de cAMP	72
2.5.1	Protocolo General del RIA de cAMP	72
2.5.2	Determinación del Título del Anticuerpo	73
2.5.3	Obtención del Marcador [¹²⁵ I]-cAMP	74
2.6	Cuantificación de Glicerolípidos	74
2.7	Determinación del Colesterol Incorporado	75
2.7.1	Cuantificación de Colesterol por Método Colorimétrico	76
2.7.2	Ensayo de Incorporación de [³ H]-Colesterol	77
2.8	Medición de la Actividad de la Enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	80
2.8.1	Protocolo de Incubación	80
2.8.2	Determinación de Fosfatos Libres	81
2.9	Medición de la Actividad de la Enzima Succínico Deshidrogenasa	81
2.10	Drogas y Solventes Generales	82
3	Mecanismo de Acción de ACTH	83
3.1	Esteroidogénesis Mediada por ACTH	85
3.2	Acción de Inhibidores de Quinasas	89
3.2.1	Efecto de Bajas Concentraciones de Staurosporina	97
3.2.2	Efecto de Altas Concentraciones de Staurosporina	101
3.3	Acción de Activadores de PKC	103
3.3.1	Efecto de DAG sobre la Aldosteronogénesis	104
3.3.2	Efecto de PMA sobre la Producción de ALDO	109
3.4	Discusión	110
4	Acción de Endotelina	117
4.1	Efectos Vasculares de Endotelina	118

4.1.1	Vasoconstricción	118
4.1.2	Actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa en Aorta	123
4.2	Efecto de ET-1 sobre la Respuesta Adrenal	124
4.2.1	Presencia de Receptores a ET en Zona Glomerulosa	124
4.2.2	Acción Esteroidogénica de ET-1	126
4.2.3	Transducción de la Señal de ET	134
4.2.4	Actividad de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa Adrenal	145
4.2.5	Relación Producción de ALDO y Actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	153
4.2.6	Incorporación de colesterol mediada por ET-1	161
4.3	Efecto de ET sobre la Aldosteronogénesis Mediada por ACTH	169
4.4	Discusión	172
5	Conclusiones	181
	Bibliografía	185
	Abreviaturas	205

Lista de Figuras

1.1	Esquema histológico de la glándula adrenal	4
1.2	Vasculatura de la glándula adrenal.	4
1.3	Estructuras básicas de los principales esteroides secretados por la corteza adrenal	6
1.4	Principal camino biosintético de esteroides en la corteza adrenal	9
1.5	Sistema de transporte de e ⁻ para los citocromos esteroideogénicos	10
1.6	Pasos biosintéticos catalizados por las dos isoenzimas P-450 _{11β} de adrenal de rata	12
1.7	Esquema de la vía de formación del cAMP	19
1.8	Estructura de los fosfolípidos mayoritarios	21
1.9	Dinámica de la producción DAG, IP ₃ y Ca ⁺⁺ citosólico, mediado por un agonista	23
1.10	Metabolismo de PIP ₂	24
1.11	Esquema de la estructura de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.	31
1.12	Esquema de Albers-Post del ciclo de funcionamiento de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	31
1.13	Estructura del glicósido ouabaína	33
1.14	Esquema de la estructura y del procesamiento post-transduccional de POMC . .	35
1.15	Estructuras de las endotelinas 1, 2 y 3 y de la sarafotoxina S _{6b}	41
1.16	Procesamiento proteolítico de la preproendotelina	42
2.1	Esquema de infusión	53
2.2	Esquema del procedimiento seguido para la obtención de fracciones subcelulares	56
2.3	Esquema de recolección del esteroide purificado por HPLC	70
2.4	Curvas realizadas para calcular el título de anticuerpo anti-esteroide	71
2.5	Reacción colorimétrica para medir colesterol	76
2.6	Curvas de calibración de colesterol	78
3.1	Ensayo de inmunoreactividad cruzada para el anticuerpo contra ALDO	86
3.2	Curva de producción de ALDO vs concentración de ACTH	87

3.3	Producción de B mediada por ACTH	88
3.4	Incremento de cAMP mediado por ACTH	90
3.5	Efecto de Staurosporina sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH	93
3.6	Efecto de St. sobre la la producción de cAMP mediada por ACTH	94
3.7	Efecto de St. sobre la esteroidogénesis mediada por diBu-cAMP	96
3.8	Efecto de St. sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH ₁₋₁₀ y ACTH ₁₁₋₂₄	98
3.9	Curva dosis resupuesta en presencia de 16 nM de St	99
3.10	Producción de ALDO mediada por DAG	105
3.11	Producción de ALDO mediada por PLC	106
3.12	Curva de producción de ALDO vs concentración de PLC	107
3.13	Curva de producción de ALDO vs concentración de R ₅₉₀₂₂	108
3.14	Efecto de PMA sobre la producción de ALDO	111
3.15	Esquema del posible mecanismo de acción de ACTH	116
4.1	Efecto de ET-1 sobre la presión arterial media	119
4.2	Efecto de BQ-123 sobre el incremento de presión arterial inducido por ET-1	122
4.3	Unión de ET a las células de glomerulosa	125
4.4	Producción de ALDO mediada por ET-1	127
4.5	Comparación de actividades estimulantes	129
4.6	Receptores involucrados en la biosíntesis de ALDO	135
4.7	Efecto de ET-1 sobre el contenido de acilgliceroles	136
4.8	Receptores involucrados en el incremento de DAG	138
4.9	Efecto de H ₇ sobre la biosíntesis de ALDO mediada por ET-1	140
4.10	Influjo de ⁴⁵ Ca ⁺⁺ mediado por ET-1	142
4.11	Efecto de verapamil sobre la biosíntesis de ALDO	144
4.12	Actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	147
4.13	Actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa en diferentes cepas de animales	150
4.14	Subpoblación de receptores involucrada en la actividad Na ⁺ /K ⁺ -ATPásica	152
4.15	Inhibición de la actividad Na ⁺ /K ⁺ -ATPásica por ouabaína	154
4.16	Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO	155
4.17	Inhibición por verapamil de las acciones de ouabaína en adrenal	157
4.18	Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO mediada por ACTH	159
4.19	Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO mediada por ET-1	160
4.20	Efecto de ET-1 sobre la incorporación de [³ H]-Colesterol	163
4.21	Efecto de ET-1 sobre el contenido de colesterol en diferentes tejidos	166

4.22 Efecto de ET-1 sobre la producción de ALDO mediada por ACTH	171
4.23 Esquema de los mecanismos de acción de ET-1 en adrenal.	180

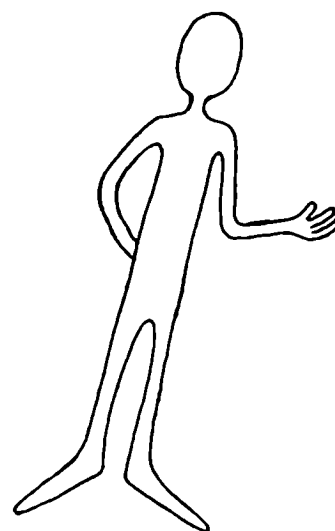
Lista de Tablas

1.1	Factores que estimulan la secreción de ALDO	15
1.2	Factores que inhiben la secreción de ALDO	17
3.1	RIA vs HPLC	85
3.2	Efecto de H ₇ y St sobre la producción de ALDO mediada por ACTH	91
3.3	Acción inhibitoria de St sobre la aldosteronogénesis mediada por CT, FK y diBu-cAMP.	100
3.4	Efecto de St 1.6 μ M	102
3.5	Acción de St y MIX sobre la respuesta adrenal a ACTH	103
3.6	Efecto de St sobre la producción de ALDO mediada por un aumento de DAG	109
3.7	Efecto de St sobre la unión de [¹²⁵ I]-ACTH	113
4.1	Incremento del hematocrito por acción de ET-1	120
4.2	Efecto de ET-1 sobre la actividad en Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa de aorta	124
4.3	Efecto de ET-1 sobre el contenido citosólico de ALDO	130
4.4	Actividad del citocromo P-450 (11 β ,18)-hidroxilasa/aldosintetasa a partir de DOC	131
4.5	Efecto de Enalapril sobre el incremento de ALDO mediado por ET-1	133
4.6	Efecto de ET-1 sobre el contenido de fosfolípidos	137
4.7	Efecto de verapamil sobre el influjo de Ca ⁺⁺ mediado por ET-1	145
4.8	Efecto de verapamil sobre el incremento de ALDO mediado por ET-1	146
4.9	Actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (<i>in vivo</i>)	148
4.10	Receptores involucrados en la actividad de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (<i>in vitro</i>)	153
4.11	Acción de ouabaína sobre el influjo de ⁴⁵ Ca ⁺⁺	156
4.12	Efecto de ET-1 sobre el contenido de colesterol	164
4.13	Colesterol en mitocondrias	167

4.14	Distribución subcelular de [³ H]-Colesterol	168
4.15	Receptores involucrados en la incorporación de [³ H]-Colesterol	169
4.16	Efecto de ET-1 sobre la producción de ALDO mediada por ACTH (<i>in vivo</i>) . .	172

Capítulo 1

Introducción



El estudio del control fisiológico de la secreción de aldosterona ha sido tema de interés de muchos investigadores. Aldosterona juega un rol vital en la homeostasis de sodio y potasio, regulando la excreción de estos cationes a través del riñón. Esta función depende de una continua adaptación de los niveles del esteroide, a los cambios producidos en el fluido corporal.

Un exceso primario en la producción de aldosterona provoca un aumento en la presión arterial media; este proceso de hipertensión sería una consecuencia indirecta de la retención de sodio, la expansión del volumen de líquido extracelular y de un ligero aumento en el volumen minuto cardíaco, producidos por el esteroide. Además, el aumento en el contenido de Na^+ y agua en las células arteriolas pueden provocar un engrosamiento arteriolar que estrecha la luz de los vasos y aumenta la resistencia periférica.

En contraste con ello, la presión arterial cae por debajo de la normal en los estados de hipoadosteronismo. Este evento es consecuencia de la hipovolemia producida, que generalmente es revertida mediante un aumento compensatorio de sustancias vasoconstrictoras como angiotensina II (A II) [1].

En la mayoría de los casos de hiperaldosteronismo primario, la lesión es una neoplasia originada en la zona glomerulosa. Así, la secreción de aldosterona es esencialmente autónoma, no dependiente del sistema renina-angiotensina.

Otra lesión causal de hiperaldosteronismo es la neoplasia de la glándula hipófisis. Esta lesión provoca hipersecreción de ACTH y en consecuencia un aumento en la esteroidogénesis adrenal. La dependencia del exceso adrenocortical sobre ACTH se demuestra suprimiendo la secreción endógena de esteroides con una dosis alta de glucocorticoides exógenos (ver sección 1.3). En esta patología se observa un aumento en los niveles de 18-oxocortisol, en paralelo a un aumento en los niveles de aldosterona [2]. 18-oxocortisol es un mineralo y glucocorticoide débil, capaz de aumentar la presión arterial cuando es administrado crónicamente a ratas [3].

De acuerdo con estudios cinéticos y de unión de esteroides a mitocondrias de adrenal, la producción de 18-oxocortisol a partir de cortisol ocurriría a través de los mismos caminos enzimáticos que transforman corticosterona en aldosterona [4,5].

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, un organismo no puede sobrevivir ante un desbalance en el contenido de mineralocorticoides en circulación, en particular aldosterona. El ajuste de los niveles de este esteroide está dado por el control de la aldosteronogénesis a través de la acción que múltiples factores ejercen directamente en el sitio de biosíntesis: la zona glomerulosa adrenal.

El mecanismo exacto responsable del control de la producción de aldosterona ha sido difícil de dilucidar. Los estudios realizados en este tema, no sólo despiertan un interés básico sino que presentan una importancia potencial en el campo de la investigación clínica, especialmente aquella relacionada con la hipertensión.

En el trabajo que aquí se presenta se estudió la acción de los péptidos adrenocorticotrofina y endotelina sobre la esteroidogénesis adrenal. El estudio estuvo enfocado en aportar evidencias acerca de los mecanismos de transducción de señales involucrados en los efectos de dichos péptidos.

1.1 La Glándula Adrenal

La anatomía de la glándula adrenal fue descrita por primera vez en el año 1563 por Bartholomeo Eustachius como "glandulae renis incumbentes" en su *Tabulae Anatomicae*. Se encuentra constituida por dos grandes zonas, de diferente origen embriológico denominadas corteza y médula adrenal. La corteza adrenal, responsable de la producción de esteroides, que se caracteriza por la presencia de abundantes inclusiones de lípidos citoplasmáticos, está formada por tres zonas concéntricas denominadas, desde la cápsula hacia el interior: zona glomerulosa, zona fasciculata y zona reticularis (ver figura 1.1) [6].

Esta división se basó primeramente en las diferencias entre la estructura de los tejidos vascular y conectivo presentes en cada zona. La zona glomerulosa constituye el 15% de la corteza y consiste de una capa poco demarcada, cuyas células yacen debajo de la cápsula. Esta zona puede ser penetrada por células de fasciculata que llegan a alcanzar la cápsula adrenal. La zona fasciculata constituye el 75% de la corteza y no está demarcada de la zona glomerulosa. Por último la zona reticularis, que se encuentra bien demarcada con respecto a la médula y a la zona fasciculata, está formada por células que presentan un citoplasma compacto debido a la baja cantidad de inclusiones lipídicas en el mismo.

La glándula adrenal es un órgano altamente irrigado; en la figura 1.2 se muestra un esquema de la vasculatura de la glándula de mamíferos. La misma está abastecida por un promedio de 11 o 12 arterias que son ramas provenientes de la aorta y arterias frénico inferior, renal e intercostal. Luego, sesenta o más arteriolas pequeñas forman un plexo arteriolar subcapsular que drena en un conjunto de capilares dispuestos radialmente, algunos de los cuales penetran hasta el interior de la zona fasciculata. Estos capilares forman un plexo sinusoidal que rodea las células reticularis y forman venas que atraviesan la médula y drenan en la vena central. Las zonas fasciculata-reticularis no están irrigadas

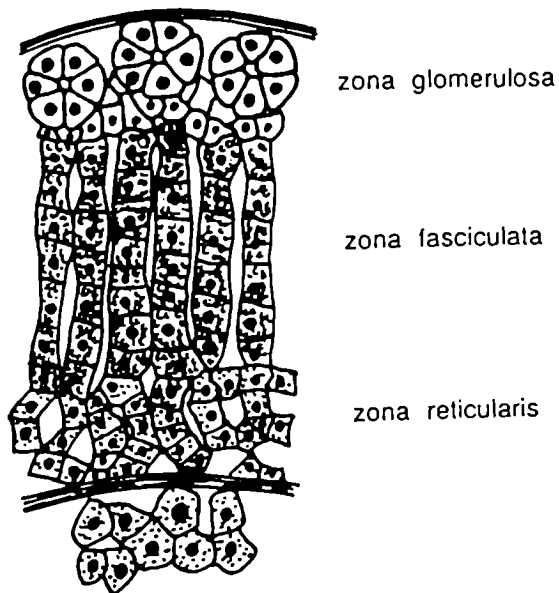


Figura 1.1: Esquema histológico de la glándula adrenal. Se indican las tres zonas de la corteza adrenal, desde la cápsula (parte superior) hasta la médula (parte inferior).

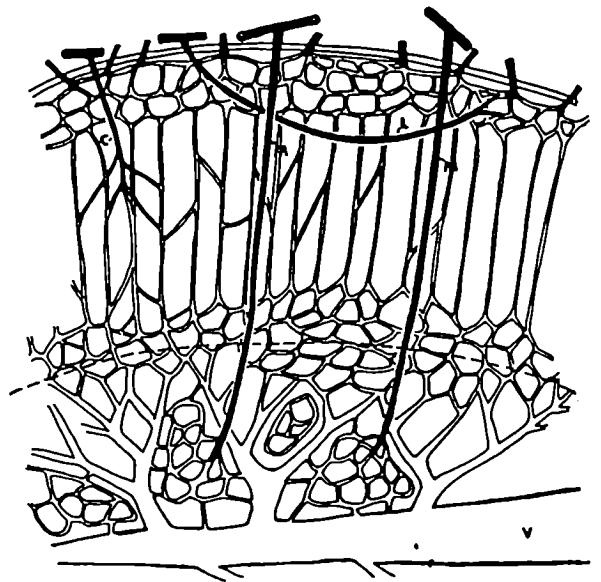


Figura 1.2: Vasculatura de la glándula adrenal. Las cavidades arteriales están marcadas con negro y las venosas con blanco. C: arteria cortical; M: arteria medular; V: vena central.

directamente por sangre arterial.

Por otro lado, una red de capilares arteriales provenientes de arterias medulares penetran hasta la corteza; esta red también drena en la vena central. Esta vena presenta de dos a cuatro zonas de músculo liso que son responsables de la contracción de la misma y en consecuencia regulan el flujo de salida de la glándula, incrementando así la exposición de las células corticales a los factores sistémicos y la exposición de las células medulares a los glucocorticoides. La vena arterial derecha drena en la vena cava inferior y la izquierda en la vena renal izquierda [7].

La corteza adrenal sintetiza y secreta, fundamentalmente, las siguientes hormonas: 1) los glucocorticoides cortisol (que es el glucocorticoide más importante en humano, cerdo, vaca y conejo) y corticosterona (que es el principal glucocorticoide en rata), cuyos efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y de las proteínas, los hacen indispensables para la vida; 2) el mineralocorticoide aldosterona, el cual es de importancia vital para mantener el balance de Na^+ y K^+ y, 3) los esteroides sexuales andrógenos y estrógenos y sus precursores, los que contribuyen a establecer y mantener los caracteres sexuales secundarios.

Todas las hormonas que se producen en la corteza adrenal representan modificaciones químicas del núcleo esteroideo que se muestra en la figura 1.3: 1) los glucocorticoides potentes requieren la presencia de una cetona en C_3 y dos grupos $-\text{OH}$ en C_{11} y C_{21} ; 2) los mineralocorticoides potentes necesitan a C_{18} oxigenado; 3) los andrógenos se caracterizan por la eliminación de la cadena lateral C_{20-21} y por tener a C_{17} oxigenado y 4) los estrógenos se caracterizan por la aromatización del anillo A.

Las células de glomerulosa parecen ser las únicas células que, en condiciones fisiológicas, pueden llevar adelante los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona (ALDO), específicamente aquellos pasos involucrados en la conversión de corticosterona (B) en ALDO. La síntesis de glucocorticoides se realiza, principalmente en la zona fasciculata, con una menor contribución de la zona reticular. Los esteroides sexuales se sintetizan principalmente en la zona reticular.

Además de las diferencias en las actividades enzimáticas presentes en cada zona de la corteza adrenal, la zona glomerulosa difiere de la fasciculata en la capacidad de respuesta a los reguladores extracelulares. La actividad secretoria de la zona fasciculata es controlada principalmente por la hormona hipofisaria adrenocorticotrofina (ACTH), mientras que la regulación en la zona glomerulosa es multifactorial. La membrana plasmática de las células de glomerulosa presenta una amplia variedad de moléculas receptoras a

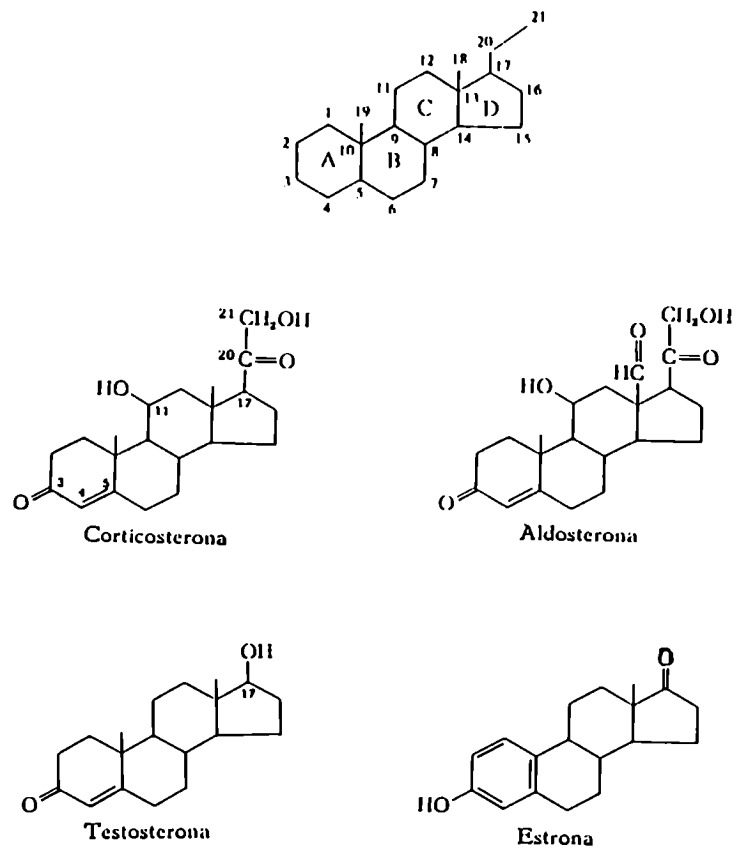


Figura 1.3: Estructuras básicas de los principales esteroides secretados por la corteza adrenal

hormonas peptídicas (angiotensinas, vasopresina, ACTH), aminas biogénicas (serotonina, dopamina) y lípidos regulatorios (prostaglandinas), además de responder a la alteración en la concentración de electrolitos del fluido extracelular, en particular al incremento en la concentración del ión K^+ [8].

1.2 Aldosterona

ALDO fue descubierta por Simpson *et al.* en 1953 (ver ref. en [7]) y es considerado el principal mineralocorticoide en mamíferos, siendo su función la de promover el transporte unidireccional de Na^+ a través del epitelio renal [9]. Su nombre deriva de la existencia de un grupo aldehído en el C_{18} (ver figura 1.4).

Las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol. Las células esteroideogénicas pueden sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato, movilizar ésteres de colesterol presentes en los reservorios celulares (“gotas lipídicas”) o bien incorporar del plasma el colesterol unido a lipoproteínas.

Alrededor del 80% del colesterol destinado a la producción de esteroides es provisto por las lipoproteínas plasmáticas y, en condiciones normales, aproximadamente el 20% de la capacidad esteroideogénica de la glándula depende de la biosíntesis intracelular del colesterol [7]. Sin embargo, Tóth *et al.* demostraron, utilizando un inhibidor de síntesis *de novo* de colesterol, que ciertos metabolitos de dicha síntesis son importantes en el control de la producción de ALDO [10].

El camino esteroideogénico lleva a la formación de esteroides cada vez más oxidados. Existen dos tipos de reacciones involucradas en este camino: las hidroxilaciones y las deshidrogenaciones.

Los avances en el camino metabólico se consiguen a través de las hidroxilaciones. Este tipo de reacciones se caracterizan por ser irreversibles, dado que: dan lugar a la formación de hormonas, utilizan O_2 y necesitan nucleótidos reducidos (NADPH) que se oxidan junto con el esteroide. La irreversibilidad se produce a través de una cadena oxidativa cuyo último eslabón es un citocromo P-450, única proteína de la cadena capaz de aprovechar el O_2 .

Los citocromos P-450 son específicos para las posiciones a hidroxilar *e.g.* el citocromo P-450_{11 β} es responsable de las hidroxilaciones en C_{11} y C_{18} , el citocromo P-450_{5CC} cataliza las hidroxilaciones en C_{20} y C_{22} . Las enzimas asociadas a la función de hidroxilación de los citocromos P-450 se denominan oxidasas de función múltiple o hidroxilasas, *e.g.* citocromo

P-450 11 β ,18-hidroxisilasa/aldosintetasa.

El segundo tipo de oxidación es la deshidrogenación. Esta reacción es dependiente del nucleótido NADP⁺. Dado el carácter oxidante de este cofactor, la deshidrogenación se lleva a cabo en ausencia de O₂. Las características generales de las deshidrogenaciones son las siguientes: son reacciones reversibles entre alcoholes y cetonas y, en general, el compuesto más oxidado es el biológicamente menos activo, asignándole al mismo un papel de sustancia de reserva, *e.g.* cortisol \longleftrightarrow cortisona.

Una excepción en estas deshidrogenaciones es la que produce la isomerización del doble enlace $\Delta^{5,6}$ a doble enlace $\Delta^{4,5}$, con la deshidrogenación simultánea del grupo -OH en C₃, *e.g.* la transformación de pregnenolona en progesterona. Esta reacción es irreversible y el metabolito más oxidado es una hormona activa.

El principal camino biosintético de ALDO que realizan las células de glomerulosa de mamíferos es el que se detalla en la figura 1.4. El primer paso, denominado paso temprano y considerado uno de los puntos regulables de dicho camino, es la transformación de colesterol en pregnenolona (P₅). Este paso está localizado en la mitocondria e involucra tres proteínas distintas.

En la figura 1.5 (panel A) se describe el proceso del sistema citocromo P-450 que consiste en la transferencia de equivalentes de reducción del NADPH a una hierro-sulfo-proteína (la adrenodoxina), a través de la flavoproteína adrenodoxina reductasa; estas proteínas se encuentran localizadas en la matriz intramitocondrial. La adrenodoxina transfiere sus electrones al citocromo P-450_{SCC} (P-450_{SCC}) localizado en el lado interno de la membrana interna mitocondrial [11]. La reacción utiliza tres moléculas de O₂ y tres moléculas de NADPH, requeridas primeramente para la hidroxilación secuencial de C₂₂ y C₂₀ y luego para la ruptura de la unión C₂₀-C₂₂ de la cadena lateral del colesterol [12].

La pregnenolona producida deja la mitocondria y viaja al retículo endoplasmático donde es transformada en progesterona (P₄) por la 3 β hidroxi-esteroide deshidrogenasa $\Delta^{4,5}$ -isomerasa. P₄ es luego hidroxilada por otro tipo de citocromo P-450: la enzima P-450 21-hidroxisilasa (P-450_{C21}); el producto de esta reacción es la 11-deoxicorticosterona (DOC). Esta hidroxisilasa microsomal es reducida por NADPH vía una flavoproteína, la citocromo P-450 reductasa (ver esquema en el panel B de la figura 1.5) [13].

Posteriormente, DOC deja el retículo endoplasmático y entra a la mitocondria. En la mitocondria ocurren las transformaciones finales que llevan a la formación de ALDO. Este paso, también denominado paso tardío, es el otro punto regulable de la esteroidogénesis adrenal. La conversión de DOC en ALDO ocurre, al menos, a través de dos

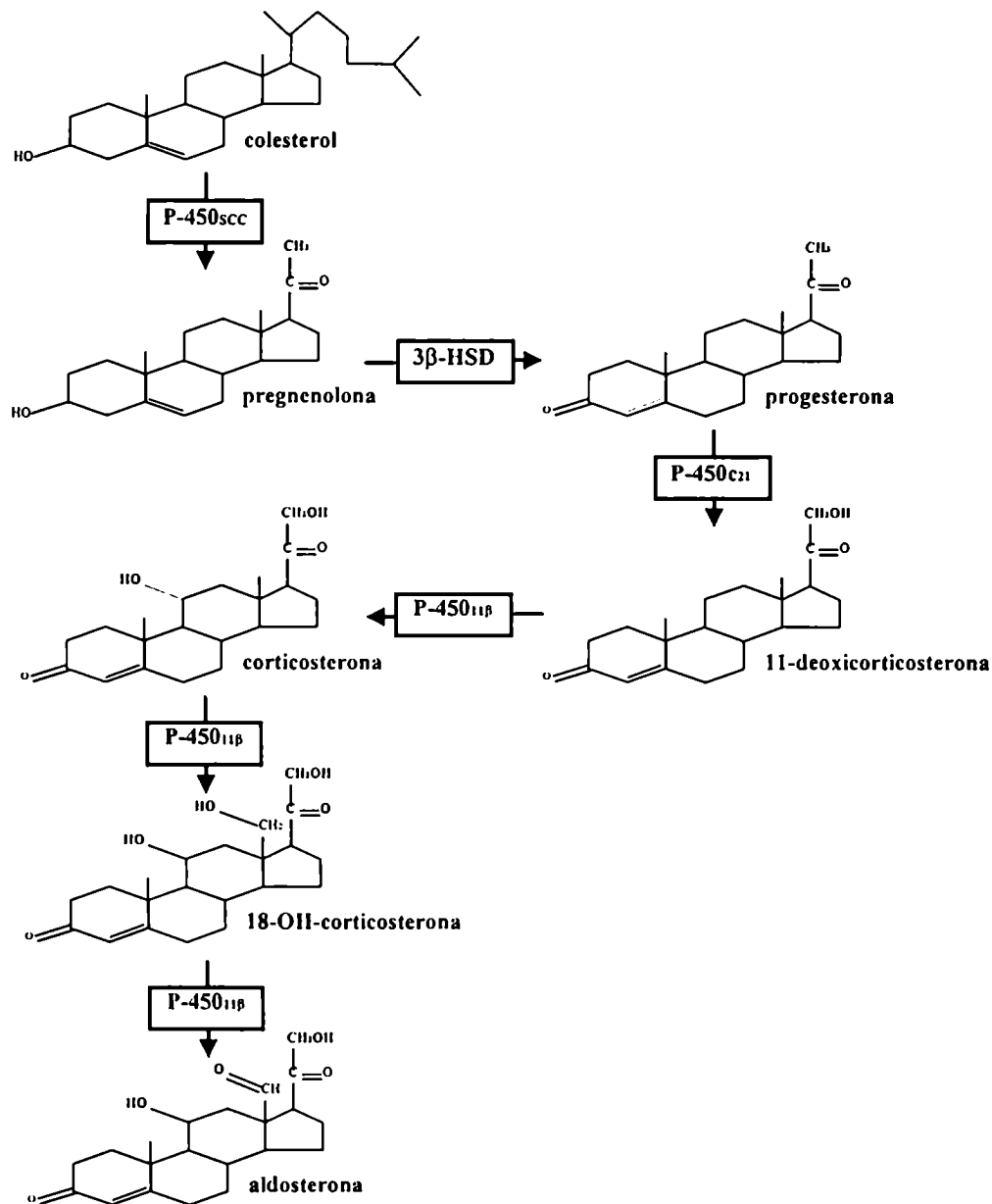


Figura 1.4: Principal camino biosintético de esteroides en la corteza adrenal
 Se esquematizan los pasos que conducen a la formación de ALDO a partir de colesterol. Las enzimas involucradas están indicadas en un recuadro. P-450_{scc}: citocromo P-450 que escinde la cadenal lateral del colesterol; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^{4,5}-isomerasa; P-450_{c21}: citocromo P-450 21-hidroxilasa; P-450_{11β}: citocromo P-450 (11β,18)-hidroxilasa/aldosintetasa. Esta última enzima podría o no ser responsable de los 3 pasos biosintéticos mostrados en la figura, dependiendo de la especie animal que se considere (ver texto).

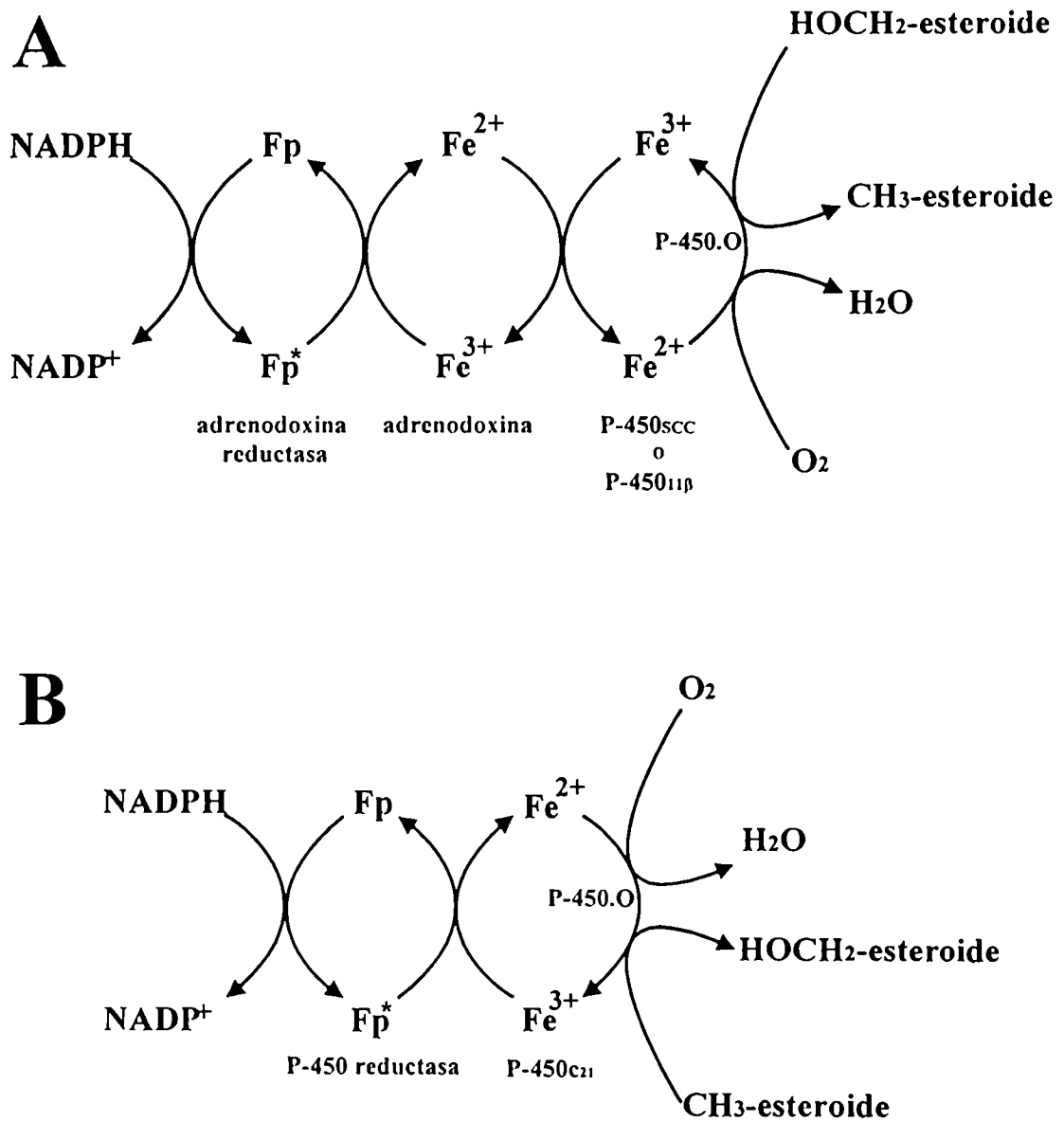


Figura 1.5: Sistema de transporte de e^- para los citocromos esteroidogénicos
 Panel A: transporte de e^- para las enzimas mitocondriales P-450_{scc} y P-450_{11β}, panel B: transporte de e^- para la enzima microsomal P-450_{c21}. Fp: flavoproteína; Fp*: forma reducida de la flavoproteína.

caminos diferentes: a) DOC \rightarrow B \rightarrow 18-hidroxicorticosterona (18-OH-B) \rightarrow ALDO y b) DOC \rightarrow 11-deoxi-18-hidroxicorticosterona (18-OH-DOC) \rightarrow 18-OH-B \rightarrow ALDO. A su vez, la transformación 18-OH-B \rightarrow ALDO podría tener vías alternativas. Cozza *et al.* han demostrado que, independientemente del camino DOC \rightarrow ALDO, la conversión de 18-OH-B en ALDO en rata, ocurriría a través de la formación del intermediario 18-deoxialdosterona (18-DAL), *i. e.* 18-OH-B \rightarrow 18-DAL \rightarrow ALDO [14].

Dado que todas estas reacciones son hidroxilaciones, las mismas están catalizadas por el citocromo P-450_{11 β} (ver figura 1.4). Esta enzima sería la responsable de la hidroxilación en C₁₁ y de dos metil-oxidaciones en C₁₈. El P-450_{11 β} utiliza equivalentes de reducción provistos por el sistema adrenodoxina/adrenodoxina reductasa (ver figura 1.5).

El número de citocromos P-450_{11 β} parece ser dependiente de la especie, encontrándose presente en ambas zonas de la corteza adrenal. Así, no queda claro por qué la producción de ALDO se limita sólo a la zona glomerulosa.

En la glándula adrenal de vaca y cerdo, todas estas reacciones serían catalizadas por una sola enzima. Sin embargo, esta hipótesis ha sido recientemente cuestionada por el grupo de Gómez-Sánchez [15].

Además, estudios realizados con anticuerpos preparados contra P-450_{11 β} purificado bovino revelaron la existencia de dos formas diferentes de la enzima: una proteína de 51-Kd presente en ambas zonas de la adrenal y otra proteína de 49-Kd presente solamente en la zona glomerulosa y cuya expresión y/o actividad serían reguladas por la ingesta de sal. [16,17]. Aunque las dos proteínas se encuentran inmunológicamente relacionadas, sus extremos NH₂-terminal presentan secuencias diferentes [18,19].

Por otro lado, estudios de clonado molecular revelaron la existencia de dos genes diferentes que codifican para P-450_{11 β} bovino, pero no es clara la relación que pudiera haber entre los productos de estos genes y las proteínas de 49 y 51-Kd [18,19]. En sistemas reconstituídos, ambas proteínas son capaces de convertir DOC en B, 18-OH-DOC, 18-OH-B y ALDO; de esta manera, la especificidad de la zona glomerulosa para producir ALDO no podría ser explicada planteando diferencias en las actividades catalíticas de las dos enzimas.

Tanto en la rata como en el humano, la situación es diferente; el citocromo P-450_{11 β} purificado de zona fasciculata o los extractos mitocondriales de dicha zona, no son capaces de convertir DOC en 18-OH-B y ALDO [20,17]. En estas especies, la biosíntesis de ALDO es específica de mitocondrias de glomerulosa debido a la presencia de un segundo tipo de citocromo P-450_{11 β} , que difiere del P-450_{11 β} mayoritario porque presenta una menor masa

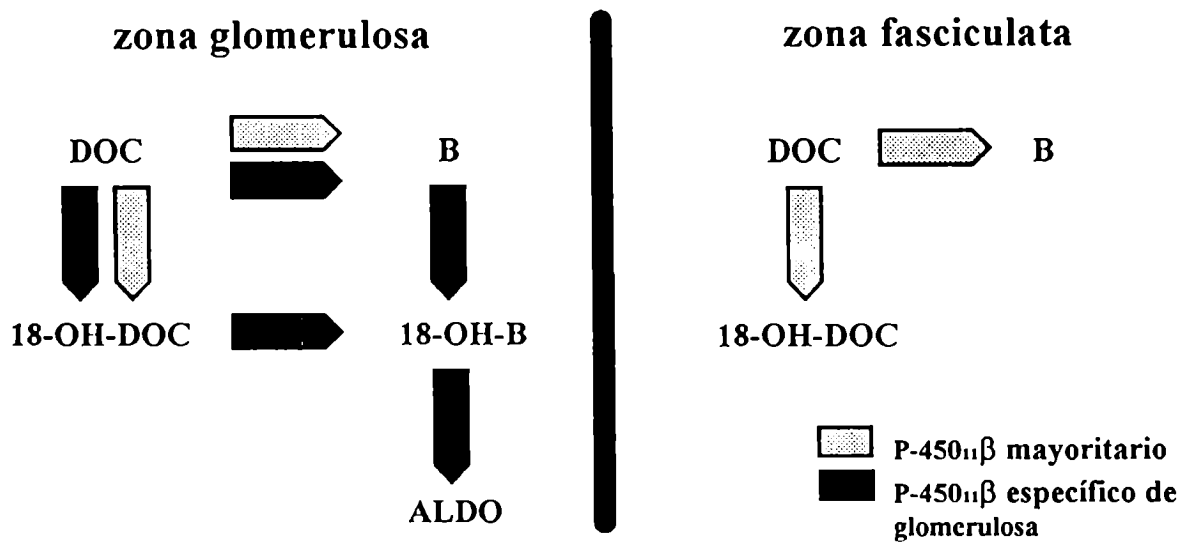


Figura 1.6: Pasos biosintéticos catalizados por las dos isoenzimas P-450_{11β} de adrenal de rata

molecular y diferentes actividades catalíticas, llevando a cabo las metil-hidroxiaciones en C₁₁ y C₁₈.

Mediante estudios de clonado y secuencia del cDNA se encontró que ambas proteínas presentan un 83% de homología en sus secuencias indicando que provendrían de dos genes diferentes [21,22]. Como se muestra en la figura 1.6 la existencia de dos citocromos explica completamente la especificidad de la producción de ALDO en la zona glomerulosa adrenal de estas especies, en particular.

1.2.1 Regulación de la Biosíntesis de ALDO

La biosíntesis de ALDO es regulada a diferentes niveles, a saber: a) la disponibilidad de colesterol, b) la actividad del citocromo P-450_{SCC} (transformación de colesterol en pregnenolona) y c) la actividad del citocromo P-450_{11β} (transformación de DOC en ALDO).

Es sabido que todos los factores que modifican la producción de ALDO, actúan sobre el paso temprano (actividad del P-450_{SCC}) tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no todos ellos tienen efecto sobre el paso tardío (actividad del P-450_{11β}) cuando se trata a las células en

forma aguda [23].

Como se mencionó, la disponibilidad de colesterol es también un proceso regulable. Varios de los factores que regulan la biosíntesis de esteroides actúan controlando la cinética de algunas de las etapas de este proceso: a) incorporación de colesterol extracelular, b) movimiento al reservorio esteroidogénico, c) esterificación y desesterificación, d) migración hasta la mitocondria y e) llegada hasta el sitio enzimático para que se lleve adelante su transformación en P_5 ("paso temprano" propiamente dicho).

El mecanismo de transporte de colesterol no es claro hasta el momento. El colesterol entra a las células a través de la unión específica de las lipoproteínas transportadoras del mismo (HDL y LDL) con los receptores presentes en la membrana celular. Dentro de la célula, la distribución del esteroles no es uniforme; la mayor concentración se encuentra en la membrana plasmática, mientras que en mitocondrias, retículo endoplasmático y otras organelas hay menor concentración [24]. El colesterol también puede encontrarse esterificado con ácidos grasos, constituyendo las "gotas lipídicas" que son los depósitos citoplasmáticos de los ésteres de colesterol.

En el caso particular de las células productoras de esteroides, las mismas tienen que dirigir el tráfico del esteroles hacia el camino esteroidogénico, *i. e.* transportan el colesterol primero hasta la mitocondria y luego, a través de la membrana externa mitocondrial y el espacio intermembrana, lo llevan hasta el citocromo $P-450_{5CC}$, ubicado en el lado interno de la membrana interna mitocondrial.

El origen del colesterol que va a ser destinado a la biosíntesis de esteroides es poco claro. Trabajos de Simpson *et al.* [25] concluyen que el pool esteroidogénico de colesterol mitocondrial es muy pequeño y que sólo una parte del total de esteroles presente en la mitocondria es destinado a la síntesis de hormonas. Por otro lado, Freeman *et al.* [26] detectaron, mediante estudios de fraccionamiento subcelular, la formación de áreas especializadas dentro de la membrana mitocondrial, que se caracterizan por presentar una disminución relativa del espacio intermembrana permitiendo así la conexión entre las membranas externa e interna mitocondriales. La formación de estas áreas se incrementa en presencia de ACTH (ver sección 1.3) y es bloqueada por la presencia de cicloheximida.

Estos estudios fueron avalados por otros ensayos que mostraron que el tratamiento de células con cAMP favorece la redistribución del colesterol celular y su utilización por la mitocondria. Este efecto es debido a la estimulación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (ver página 20) que fosforila a la enzima colesterol-éster-hidrolasa, incrementando así la transformación de los ésteres de colesterol en colesterol libre. En presencia de ciclo-

heximida el colesterol libre producido se acumula en la mitocondria pero no es utilizado para la síntesis de P_5 [27], sugiriendo la existencia de algún factor inducible que favorece el pasaje del colesterol desde la membrana externa a la membrana interna mitocondrial.

La regulación del último paso de la biosíntesis de ALDO, el paso tardío, se hace observable mediante tratamientos prolongados *in vivo* tales como alteraciones en el nivel de sodio o potasio, hipertensión de origen renal o tratamiento crónico con ACTH [28,29]. Como se ha mencionado, ALDO puede ser producida a partir de DOC a través de, al menos, dos caminos alternativos (ver figura 1.6). Ninguno de los puntos que conforman estos dos caminos son igualmente regulables. La restricción de sodio o la carga de potasio favorecen la 18-hidroxilación de B, la 11β -hidroxilación de 18-OH-DOC y la transformación de 18-OH-B hasta ALDO y minimiza la conversión de DOC en 18-OH-DOC. Por otro lado, el tratamiento prolongado con ACTH afecta a las mismas actividades enzimáticas de manera totalmente inversa [30,31,32].

Los factores involucrados en la regulación de la producción de ALDO ejercen sus efectos a través de casi todos los mecanismos de transducción de señales descritos. La mayoría de estos mecanismos crean un entorno en el cual se produce un aumento en el grado de fosforilación de varias proteínas intracelulares, responsables, probablemente, del aumento en la actividad de las enzimas esteroideogénicas.

Si bien se ha identificado una amplia variedad de factores que regulan la producción de ALDO, poco se sabe acerca del verdadero rol fisiológico de los mismos. Tampoco se conoce en detalle el mecanismo por el cual los diferentes sistemas de mensajeros intracelulares provocan los cambios en la actividad de las enzimas esteroideogénicas [33].

Los agentes que estimulan la secreción de ALDO pueden dividirse en varios grupos, siendo los siguientes los que presentan las acciones más potentes: a) los péptidos vasoactivos, b) el potasio y c) los factores pituitarios. En la tabla 1.1 se presenta una lista de factores que aumentan la secreción de ALDO *in vivo* e *in vitro*.

El péptido vasoactivo angiotensina II (A II) es el mayor regulador fisiológico de la función de la glomerulosa adrenal. A II es un octapéptido producto final del clivaje proteolítico del sustrato angiotensinógeno, a través de la renina, y de la sucesiva transformación del producto de dicha proteólisis (el péptido angiotensina I) por medio de una enzima convertidora.

El sistema renina-angiotensina circulante se modifica por una serie de factores incluyendo el sistema adrenérgico, los cambios en el volumen del fluido corporal y el nivel de sodio y potasio. Así, A II media una parte de las acciones de esos factores sobre la

Tabla 1.1: Factores que estimulan la secreción de ALDO. (Esta tabla fue obtenida de[33]).

Estimulador	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
ACTH	+	+
A II	+	+
K ⁺	+	+
Serotonina	+	+
Vasopresina	?	+
Acetilcolina	?	+
β -adrenérgicos	?	+
PTH	?	+
Endotelina	?	+
EGF	?	+

producción de ALDO [34].

De acuerdo con ensayos realizados con radioligandos, A II interactúa con un receptor específico, presente en la membrana de la célula de glomerulosa. El holoreceptor de A II está compuesto por dos subunidades de aproximadamente 65 Kd cada una y presenta propiedades diferentes dependiendo de la especie y el órgano blanco donde es expresado [35].

A II estimula la producción de ALDO a través de un sistema de señales mediado por Ca⁺⁺. La formación de ALDO mediada por A II es dependiente de la concentración de Ca⁺⁺ extracelular [36] e influenciada por la presencia de agonistas y antagonistas de canales de Ca⁺⁺ [37,38]. A su vez A II estimula la entrada y salida de ⁴⁵Ca⁺⁺ en la célula [39,40] y aumenta el nivel de Ca⁺⁺ citosólico [41].

Si bien el aumento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular ([Ca⁺⁺]_i) es debido, principalmente, a que A II estimula la hidrólisis de fosfolípidos y como consecuencia de ello provoca un aumento en el contenido de diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-inositoltrifosfato (IP₃) [42,43]; el mecanismo por el cual A II estimula el pasaje de Ca⁺⁺ a través de la membrana celular, no es muy claro. Algunos trabajos sugieren que los canales de Ca⁺⁺ sensibles al voltaje estarían involucrados en ese proceso [44,45]. También se ha descrito que el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺, que es influenciado por los cambios producidos en el potencial de membrana, puede ser afectado por la concentración de Na⁺ intracelular [46].

Se ha demostrado que A II inhibe a la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa, sugiriendo que esta

acción produciría una despolarización de la membrana plasmática y como consecuencia estimularía la entrada de Ca^{++} a la célula. Este mecanismo podría ser un camino adicional que conduce a un aumento en la aldosteronogénesis, mediado por A II [47].

Por otro lado se ha reportado que A II inhibe la actividad de la adenilciclasa y regula el metabolismo del ácido araquidónico en células de glomerulosa [23,48].

El tratamiento crónico con A II provoca un incremento en el número de receptores de dicho péptido y, además, incrementa la actividad de las enzimas esteroideogénicas involucradas en ambos puntos regulables de la producción de ALDO. En particular, ha sido descrito que el tratamiento prolongado con A II a cultivos de células de glomerulosa bovina, estimula la síntesis de mRNA del citocromo P-450_{11 β} [49].

El ión K^+ es un potente estimulador de la secreción de ALDO *in vivo* e *in vitro*. Al igual de A II, este ión ejerce efectos tróficos sobre la glomerulosa adrenal; estos efectos incluyen la activación de los citocromos involucrados en ambos puntos regulables de la biosíntesis de ALDO. Además, el tratamiento prolongado con dieta de alto K^+ provoca el incremento de la expresión del mRNA del P450_{11 β} [33].

El mecanismo de acción del K^+ involucra un aumento de la $[\text{Ca}^{++}]$; a través de la apertura de canales voltaje-dependientes. En efecto, la presencia de nifedipina (bloqueante de los canales de Ca^{++} voltaje-dependiente) inhibe la producción de ALDO mediada por K^+ [50]. Además, mediante mediciones de la $[\text{Ca}^{++}]$; detectada por Quin-2, se estableció una correlación entre la concentración de Ca^{++} citosólico y la secreción de ALDO, mediados por K^+ [41,51].

Por otro lado, ha sido sugerido que el K^+ afecta la generación de cAMP; sin embargo, no está claro si ese efecto es directo o es una consecuencia de los cambios que provoca en el nivel de Ca^{++} citosólico [23].

Los factores hipofisarios que incrementan la secreción de ALDO son: la vasopresina y los productos de la proopiomelanocortina (POMC); estos incluyen a la ACTH, la hormona α -melanocito estimulante, β -melanocito estimulante y a las β -endorfinas. De todos ellos, el factor más potente en la producción de ALDO es el péptido ACTH¹.

Por último, se han descrito una serie de factores que regulan negativamente la producción de ALDO, siendo en general todos ellos factores natriuréticos. Estos factores modifican la contractibilidad vascular y probablemente el pasaje de Na^+ a través del tú-

¹Dado que el presente trabajo está dirigido, en parte, a estudiar la acción y los mecanismos de acción de dicha hormona, la descripción de sus características estructurales y funcionales se presenta en forma detallada en una sección independiente (ver sección 1.3 en la página 34).

bulo renal, además de inhibir la biosíntesis de ALDO. Así, la disminución de la secreción de ALDO formaría parte de un objetivo que es el de reducir la retención de Na^+ [23]. En la tabla 1.2 se presenta una lista de algunos de dichos factores.

Tabla 1.2: Factores que inhiben la secreción de ALDO. (Esta tabla fue obtenida de [33]).

Inhibidores	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Dopamina	+	?
Somatostatina	+	+
Péptido Natriurético Atrial (ANP)	+	+
Encefalinas	?	+
Citoquininas	?	+
Péptido Natriurético de cerebro (BNP)	+	+

1.2.2 Efectos Primarios y Mediación Intracelular

Los sistemas de transducción de señales más importantes involucrados en la actividad de las células de glomerulosa incluyen: a) la formación de cAMP, b) la regulación de los niveles del Ca^{++} citosólico, c) la activación de la PKC a través de la hidrólisis de fosfolípidos y d) la modificación del potencial de membrana. A continuación se presenta un simple detalle del funcionamiento de dichos procesos y su relación con la producción de esteroides.

Formación de cAMP: El nivel intracelular de cAMP depende en gran medida de la interacción ligando-receptor. El evento fisiológico que produce el incremento de cAMP involucra tres proteínas localizadas en la membrana plasmática: el receptor, el transductor de la señal (la proteína G) y el efector (la enzima adenililciclase). La diversidad de la señal es dependiente de la heterogeneidad de los primeros dos componentes, dado que el efector pareciera ser único.

Los receptores que se acoplan a proteínas G poseen siete regiones α -hélice hidrofóbicas correspondientes a siete dominios transmembrana. La variabilidad de estas hélices en la región extracitoplasmática es responsable de la diferencia funcional de los mismos con respecto a la especificidad de ligando. Dos dominios importantes para el funcionamiento

de este tipo de receptores son el dominio de acople con la proteína G y el dominio que media la desensibilización del receptor. Este proceso de desensibilización requiere generalmente de algunas quinasas citoplasmáticas (*e.g.* la proteína quinasa dependiente de cAMP: PKA) para desacoplar al receptor de la proteína G asociada [52,53].

Las proteínas G están ubicadas topológica y funcionalmente entre el receptor y el efector. Han sido descritos hasta la fecha más de 30 miembros de la familia de estas proteínas que interactúan con distintos tipos de efectores. Las proteínas G son heterotrímeros compuestos por tres subunidades diferentes: α (de masa molecular entre 39-46 Kd), β (37 Kd) y γ (8 Kd). Las subunidades β y γ se encuentran formando un complejo y funcionan como una única unidad. Dado que la unidad $\beta\gamma$ puede unirse a diferentes tipos de subunidad α , la identidad de esta última subunidad es la que definiría a una proteína G determinada [54]. En particular, la actividad adenililciclase se regula a través de las proteínas G estimuladora (G_s) o G inhibitoria (G_i), donde la diferencia entre ambas está dada por la identidad de la subunidad α (α_s y α_i).

La subunidad α presenta un único sitio de unión a nucleótidos de guanina (GDP o GTP). La forma de α -GDP se une fuertemente al complejo $\beta\gamma$ y es inactiva, mientras que la forma α -GTP se disocia de $\beta\gamma$ y sirve como regulador de la proteína efectora. La subunidad α posee también una actividad de GTPasa intrínseca y así hidroliza al GTP unido transformándolo en GDP y fosfato libre.

Los estudios de clonado molecular han provisto evidencias acerca de la organización de cada una de las subunidades de la proteína G. En particular, cada subunidad α posee cinco dominios: a) el sitio de unión a GTP, b) el dominio de GTPasa, c) el sitio de unión al receptor, d) el sitio de unión al efector, (éstos dos últimos localizados en el extremo COOH-terminal) y e) un dominio que involucra la interacción con $\beta\gamma$ (cercano al extremo NH₂-terminal) [55].

El mecanismo general de la activación de la adenililciclase se esquematiza de manera simple, en la figura 1.7. En ausencia de ligando, el receptor interacciona directamente con el heterotrímero G. En este estado, la velocidad de disociación de GDP de la subunidad α es baja y limita la actividad de GTPasa del complejo. La presencia de ligando provoca la formación del complejo hormona-receptor que promueve la disociación del GDP de la subunidad α y permite la unión del GTP a la misma. Esta unión provoca: a) la disociación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$, b) una disminución de la afinidad del receptor por el ligando, c) la formación de una subunidad α activada que puede interactuar con la adenililciclase y d) la inducción de la actividad de GTPasa. La presencia de esta actividad

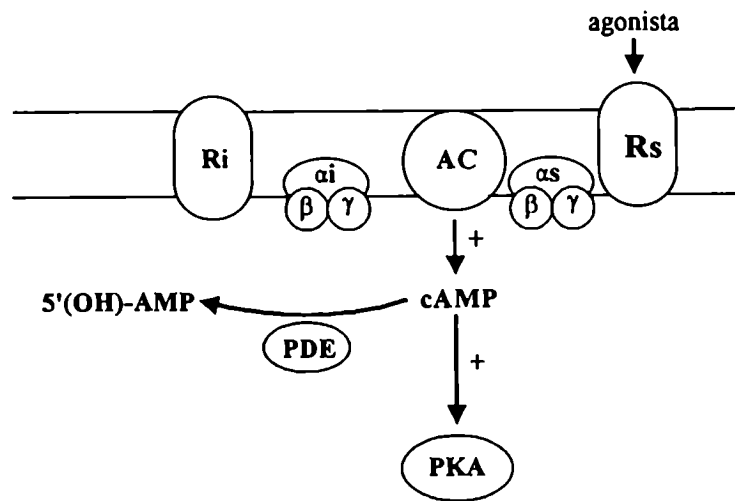


Figura 1.7: Esquema de la vía de formación del cAMP

GTPásica permite que la relación GDP/GTP sea favorable a la unión de GDP con la subunidad α ; de esta manera, el proceso de activación se rompe y ofrece la posibilidad de que el ciclo de transducción de la señal pueda ser reestablecido.

En algunos casos, las subunidades α poseen residuos específicos que pueden ser modificados covalentemente por toxinas bacterianas. La toxina del Cólera cataliza la transferencia de una ADP-ribosa desde NAD a un residuo Arg específico presente en algunas subunidades α (e.g. α_s). Esta modificación activa constitutivamente a estas proteínas, inhibiendo la actividad de GTPasa; de esta manera el efector (la adenililciclase) se mantiene constantemente activado.

Por otro lado, la toxina de Pertussis ADP-ribosila aquellas subunidades α que poseen residuos específicos de Cys cercanos al extremo COOH-terminal (e.g. α_i). Esta reacción provoca un desacople de G_i con el receptor, resultando en este caso, una activación constitutiva de la ciclase [56].

El rol del dímero $\beta\gamma$ no es muy claro. En este modelo en particular, se sugiere que el dímero sirve como regulador negativo de la actividad de α_s , e.g. la proteína G_i inhibe la adenililciclase proveyendo un exceso de subunidades $\beta\gamma$ que se unen a α_s , limitando así

el proceso estimuladorio.

Diferentes reportes han demostrado que algunas de las subunidades de la proteína G son blanco de fosforilación de quinasas, en particular de PKC [57,58]. En efecto, ha sido descrito que los esteroides de forbol potencian la producción de cAMP mediada por ACTH en células de adrenal bovina, sugiriendo que PKC activada (por ésteres de forbol) fosforilaría a la subunidad β y en consecuencia inhibiría la asociación de $\beta\gamma$ a α , [57].

La adenililciclase es una glicoproteína formada por un único polipéptido que presenta 12 dominios transmembrana (masa molecular aproximada: 115 a 150 Kd). La interacción con la subunidad α , provoca un aumento de la actividad de la enzima, que convierte ATP en cAMP; así, el cAMP formado interacciona con PKA.

PKA es un tetrámero constituido por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. En ausencia de cAMP las subunidades regulatorias se encuentran unidas a las catalíticas manteniéndolas inhibidas. Sin embargo, en presencia del nucleótido, el mismo se une a las subunidades regulatorias, disociándolas de las catalíticas, dando lugar a la actividad de quinasa. PKA activada es capaz de fosforilar restos Ser/Tre de diversas proteínas presentes en la célula regulando, de esta manera, la respuesta biológica. Una de las proteínas blanco de PKA sería el citocromo P-450_{11 β} [59].

Por otro lado, cAMP puede ser transformado en 5'(OH)-AMP por la acción de fosfodiesterasas (PDE); las mismas juegan un rol crítico en la terminación de la señal. Se han descrito varias familias de isoenzimas, siendo la que presenta mayor afinidad por el cAMP la denominada PDE de "bajo K_m " o PDE de cAMP. Aunque es capaz de hidrolizar cAMP a niveles fisiológicos, su velocidad máxima es muy baja. Esta PDE es regulada por muchas hormonas. Aquellos factores que incrementan su actividad, están involucrados en la regulación aguda de una respuesta. Así, provocan la destrucción del segundo mensajero tan rápido como lo generaron. Entre los factores que controlan la actividad de PDE se encuentran: la insulina, el glucagon, la hormona de crecimiento y ACTH. Debido a la rapidez de respuesta (30-60 seg.), se supone que dicha regulación es mediada por fosforilaciones y desfosforilaciones [60].

Por otro lado, las metilxantinas (*e.g.* la teofilina y la metil-isobutil-xantina), inhibidores competitivos de PDE, provocan un aumento en los niveles de cAMP.

En la corteza adrenal, cAMP es el principal mensajero que media el estímulo del péptido ACTH (ver sección 1.3). cAMP media la rápida movilización de colesterol producida como respuesta al agonista y está involucrado en la traslocación del colesterol desde las "gotas lipídicas" hasta la mitocondria, específicamente hasta la vecindad del P-450_{SCC}

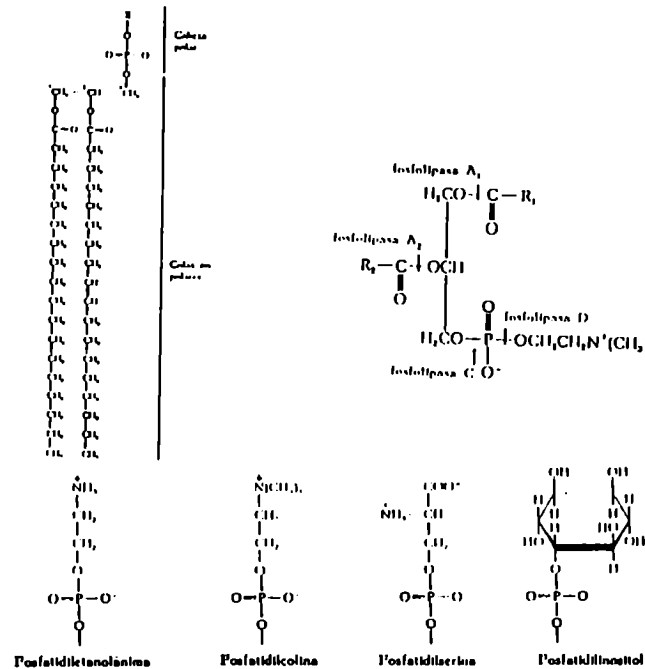


Figura 1.8: Estructura de los fosfolípidos mayoritarios

en la membrana interna mitocondrial [61]. Por otro lado, en tratamientos crónicos con el agonista, cAMP media la síntesis de los citocromos P-450_{SCC}, P-450_{11β} y P-450_{C21} así como la síntesis de las flavoproteínas involucradas en el camino esteroideogénico [62,63,64, 65,66]. En general el incremento de cAMP optimiza la capacidad esteroideogénica en la corteza adrenal [12].

Metabolismo de fosfolípidos: Muchos productos del clivaje de fosfolípidos de membrana plasmática han demostrado ser sustancias biológicamente activas como mensajeros de alguna señal disparada por un agonista. En los últimos años, se ha encontrado que un número considerable de fosfolipasas son activadas de manera señal-dependiente (*e.g.* fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A₂ (PLA₂)). Entre los fosfolípidos que son sustratos de esas fosfolipasas se encuentran, el fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfato (PIP₂), la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), y la esfingomiélna (SM) [67]. En la figura 1.8 se esquematizan las estructuras de los diferentes fosfolípidos y los sitios de clivaje catalizados por las diferentes fosfolipasas.

En particular en la zona glomerulosa adrenal, un gran número de hormonas y ligandos,

e.g. A II, median sus acciones a través de la hidrólisis por PLC de los fosfoinosítidos como PIP₂. De esa manera, dos segundos mensajeros son producidos: el (1,4,5)-inositoltrifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG) (ver figura 1.8). IP₃ eleva los niveles de Ca⁺⁺ citosólico y DAG aumenta la afinidad por Ca⁺⁺ de la proteína quinasa dependiente de Ca⁺⁺ y fosfolípidos, PKC (ver sección 1.2.2).

El mecanismo por el cual un agonista estimula este sistema de señal es el siguiente: el complejo hormona-receptor se acopla a una proteína G que media la activación de PLC.

La presencia de una proteína G en este proceso, ha sido demostrada por varios investigadores. En efecto, ensayos realizados con toxina de Pertussis demostraron que la misma inhibe la formación de IP₃ mediada por un agonista [68]. Por otro lado, la ausencia de GTP bloquea los efectos de vasopresina sobre la producción de IP₃ y la presencia de análogos no hidrolizables de GTP estimula tanto la actividad de PLC como la formación de IP₃ [69].

PLC cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP₂) para formar IP₃ y DAG. Esta enzima presenta una variedad de isoformas que difieren en masa y características estructurales e inmunológicas. De todas maneras todas son específicas de PIP₂.

La acumulación de IP₃ es bifásica, como se muestra en la figura 1.9. IP₃ presenta un máximo dentro de los 10-15 seg. de ocurrido el estímulo, mientras que la hidrólisis de PIP₂ se mantiene durante varios minutos. La producción de IP₃ es controlada por varios mecanismos de retroalimentación negativa que por un lado incrementan la rápida metabolización y por el otro disminuyen la formación del mismo. En la figura 1.10 se muestra el camino metabólico de los fosfoinosítidos. Varios estudios mostraron que IP₃ puede ser fosforilado a 1,3,4,5-IP₄ por la 3-quinasa dependiente de Ca⁺⁺/calmodulina, activada por Ca⁺⁺. También puede ser desfosforilado a 1,4-IP₂ por dos 5-fosfomonoesterasas activadas por PKC [70].

La formación de IP₃ es también inhibida por PKC, habiendo sido propuestos varios sitios de acción para dicha enzima. Se ha demostrado que algunos receptores pueden ser fosforilados disminuyendo así la afinidad por el agonista.

Otro punto susceptible de ser afectado por la quinasa es el acople entre la proteína G y el efector. Se ha demostrado que varias proteínas G pueden ser fosforiladas por PKC, sin embargo, no hay suficientes evidencias que indiquen que G activa y funcionalmente acoplada a PLC pueda ser sustrato de la quinasa [71]. Por otro lado, el "pool" de PIP₂ es restablecido por la acción de quinasas de PI y PIP [72]. La gran cantidad de PI y la alta actividad de estas quinasas que producen PIP₂ regulan la producción de IP₃ ofreciendo

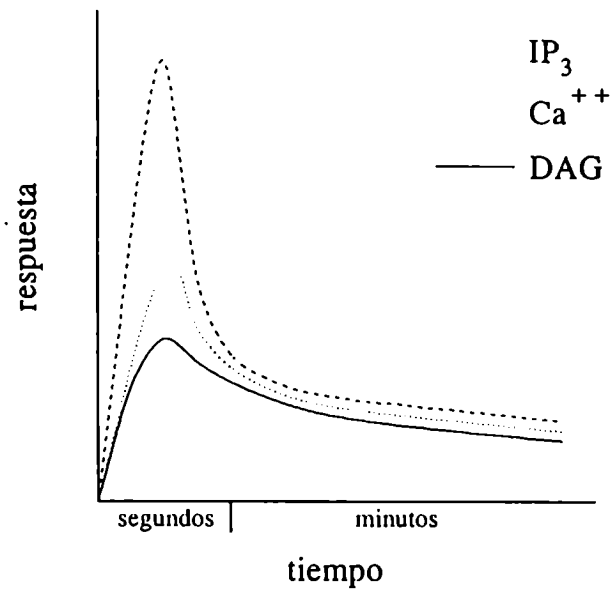


Figura 1.9: Dinámica de la producción DAG, IP_3 y Ca^{++} citosólico, mediado por un agonista. Esquema representativo de los cambios en los niveles de dichos compuestos en una célula ideal en respuesta a la estimulación con un agonista que moviliza Ca^{++} .

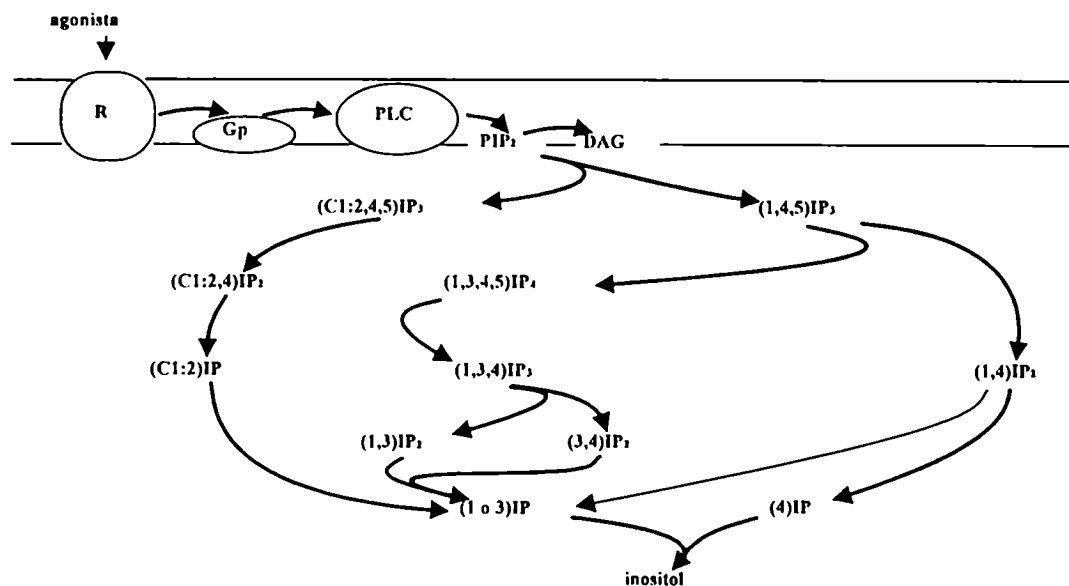


Figura 1.10: Metabolismo de PIP_2 .

una mayor disponibilidad de sustrato.

IP_3 estimula la liberación de Ca^{++} a través de la interacción con sitios receptores presentes en el retículo endoplasmático. La unión de IP_3 con su receptor es específica, saturable y reversible [73].

La respuesta de DAG es también bifásica, (ver la figura 1.9); un pico temprano y transiente es seguido por una fase tardía que comienza a hacerse evidente luego de varios minutos de disparada la señal. Mediante estudios realizados con ésteres de forbol, considerados análogos estructurales de DAG y que activan a PKC, se demostró que la formación de DAG tardío es un prerrequisito para los efectos a largo plazo de la quinasa (*e.g.* proliferación y diferenciación celular, ver [74] y sus ref.).

Si bien la fuente de DAG es principalmente la hidrólisis de fosfoinosítidos, DAG puede formarse también a partir de la hidrólisis de PC, mediada por una PLC; alternativamente, DAG puede producirse en forma indirecta vía PLD, rindiendo ácido fosfatídico que es luego desfosforilado por una fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (PAP).

Por otro lado, DAG puede formarse por síntesis *de novo*. En efecto, ha sido reportado que hormonas como ACTH e insulina estimulan la síntesis *de novo* de DAG [75,76].

El ión calcio: Ca^{++} es un regulador primario de la función fisiológica de todas las células. Su rol como mensajero intracelular fue evidenciado por Sydney Ringer quien encontró que dicho ión promovía la contracción del músculo cardíaco (ver ref. en [77]).

En la glándula adrenal, el aumento en la $[\text{Ca}^{++}]$; media las acciones de muchos estimuladores de la biosíntesis de esteroides. En efecto, mediante estudios realizados con células de glomerulosa de rata y perro, se demostró que la respuesta esteroideogénica a ACTH, A II y K^+ es dependiente de la concentración de Ca^{++} extracelular [36]. Por otro lado, la presencia de ionóforos (*e.g.* A_{23187}) y de agonistas de canales de Ca^{++} (*e.g.* BAY K 8644) estimula la esteroideogénesis [37,78].

El ión Ca^{++} modula la actividad de algunas proteínas quinasas a través de su unión a una proteína regulatoria, la calmodulina. Esta proteína consiste de 148 aminoácidos y esta compuesta por dos extremos globulares separados por una estructura de α -hélice formada por siete vueltas. Cada uno de esos extremos globulares contiene dos sitios de unión a Ca^{++} . Los sitios ubicados en la mitad COOH-terminal presentan una afinidad ligeramente mayor por el ión, que aquellos sitios ubicados en la mitad NH_2 -terminal; la mayoría de las constantes de disociación reportadas se encuentran dentro del rango 10^{-5} y 10^{-6} M (ver [60] y sus ref.).

La mitad NH_2 -terminal de la α -hélice es rica en aminoácidos hidrofóbicos mientras que, la mitad COOH-terminal es rica en aminoácidos ácidos. La α hélice es el sitio de interacción entre la calmodulina y las proteínas que ella activa, sugiriendo que esas proteínas interactuarían a través de alguna estructura de hélice "anfifílica" similar a la que presenta calmodulina [79].

Datos estructurales sugieren un mecanismo de activación de calmodulina por Ca^{++} . En ausencia del ión, los extremos se encuentran colapsados y cubren el sitio de unión a otras proteínas; así, calmodulina es inactiva. En presencia de Ca^{++} , los extremos se exponen para formar el bolsillo que interacciona con el ión; de esa manera, el sitio de unión a proteínas queda descubierto y calmodulina es activa.

La actividad de muchas enzimas es regulada por Ca^{++} -calmodulina, en particular la proteína quinasa de tipo II, dependiente de calmodulina. Esta enzima, de 600-650 Kd, está compuesta de 12 unidades dispuestas en dos hexágonos. La quinasa contiene dos subunidades diferentes, pero que presentan una alta homología entre ellas, la subunidad α de 50 Kd y la β de 60 Kd. La relación cuantitativa entre ambas subunidades difiere en los distintos tejidos constituyendo así, diferentes isoenzimas (se han reportado al menos cinco formas en mamíferos).

Todas las subunidades de la proteína quinasa son catalíticas, unen calmodulina y pueden ser fosforiladas. Además, calmodulina estimula la actividad catalítica y la autofosforilación produce una enzima independiente de Ca^{++} -calmodulina (ver [60] y sus ref.).

El mecanismo por el cual los diferentes factores controlan la actividad de calmodulina es alterando la concentración de Ca^{++} citosólico. La expresión de esta proteína no parece ser regulada, en forma aguda, por hormonas; ésto es, calmodulina es sintetizada en forma constitutiva.

La respuesta de Ca^{++} en células no excitables es generada por medio de tres eventos principales: a) la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares, b) su eflujo desde el medio intracelular al extracelular y c) el influjo de dicho ión. Sin bien hay descritos una serie de mecanismos universales para modificar la $[\text{Ca}^{++}]_i$, cada tipo celular expresará uno, algunos o todos esos mecanismos. Así, el incremento de la $[\text{Ca}^{++}]_i$ producido en respuesta a un estímulo, será específico del tejido y el agonista en cuestión.

Liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares: La presencia de un estímulo puede provocar, inicialmente, un incremento del Ca^{++} citosólico liberado por los depósitos intracelulares de dicho ión. Este proceso puede ser o no dependiente de un incremento en la concentración de IP_3 (ver página 24). Este incremento rápido y transiente es seguido por una caída hasta alcanzar un estado estacionario superior al basal que se mantiene durante varios minutos, dependiendo del agente estimulante. Esta segunda fase es consecuencia de la apertura de canales presentes en la membrana plasmática, voltaje dependiente o activados por un receptor [80] (ver esquema en la figura 1.9).

En el caso particular de la célula de glomerulosa, una alta densidad de sitios de unión específicos para IP_3 han sido descritos en retículo endoplasmático, indicando que el incremento inicial de Ca^{++} citosólico es debido a liberación del ión de los depósitos intracelulares, mediada por IP_3 ([81] y sus ref.). Este mecanismo es utilizado por algunos agonistas de la producción de ALDO, *e.g.* A II (ver detalles en la página 15).

Finalmente, la señal de Ca^{++} es controlada también por mecanismos de retroalimentación negativa inducidos por el mismo ión y por la activación de PKC [71]. Los puntos postulados como blancos de la regulación negativa mediada por Ca^{++} son: a) la inhibición de la interacción de IP_3 a su receptor, b) la transformación de IP_3 en 1,3,4,5- IP_4 catalizada por la enzima 1,4,5- IP_3 -quinasa activada por Ca^{++} -calmodulina y la disminución de Ca^{++} citosólico debida a la activación de Ca^{++} -ATPasas activadas también, por Ca^{++} -calmodulina. PKC por otro lado, afecta la actividad del sistema de transducción

“receptor–proteína G–PLC” disminuyendo así, la velocidad de generación de IP_3 y además aumenta su degradación activando a una inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa (ver [71] y sus ref.).

Eflujo de Ca^{++} : El eflujo de Ca^{++} de las células es un evento que se produce temporalmente a continuación de la liberación del ión de los depósitos intracelulares. En el caso particular de la estimulación de la biosíntesis de esteroides, este evento es atribuido principalmente al incremento de Ca^{++} citosólico inducido por IP_3 , el cual estimula la Ca^{++} -ATPasa dependiente de calmodulina y el intercambiador Na^+/Ca^{++} . Durante los primeros minutos se produce una pérdida neta de Ca^{++} hasta llegar a un balance entre la velocidad de salida y la velocidad de entrada provocada por el agonista [71].

El eflujo de Ca^{++} puede atribuirse también a alguna otra causa dado que en la etapa tardía (fase sostenida) la velocidad de intercambio de Ca^{++} a través de la membrana se encuentra incrementada [82]. En efecto, estudios realizados en una amplia variedad de células sugieren que la activación de PKC estimularía el eflujo de dicho ión mediante la fosforilación y consecuente activación de Ca^{++} -ATPasa [83].

Influjo de Ca^{++} : Una respuesta hormonal sostenida (que provoca la liberación del ión al citosol) requiere de la entrada de Ca^{++} a la células para mantener los niveles aumentados de Ca^{++} libre citosólico. Además, los cambios en el potencial de membrana mediados por la acción de un agonista también pueden provocar la entrada de Ca^{++} extracelular, *e.g.* la presencia de K^+ extracelular provoca una despolarización de la membrana plasmática y en consecuencia la apertura de canales de Ca^{++} voltaje-dependientes.

Las evidencias de la existencia de un incremento en la entrada de Ca^{++} en presencia de un estímulo provienen de estudios de: a) respuesta celular en función de la $[Ca^{++}]$ extracelular y b) el influjo de $^{45}Ca^{++}$ [82].

En la zona glomerulosa adrenal ha sido descrita la presencia de canales de Ca^{++} voltaje-dependientes [84], ellos son los denominados del tipo L, que se encuentran en mayor proporción, y los del tipo T. Mediante el uso de bloqueantes de la actividad de estos canales (*e.g.* nifedipina, verapamil y tetrandina) ha sido demostrado que la apertura de canales de Ca^{++} activados por voltaje juega un rol importante en la esteroidogénesis mediada por A II, K^+ y ACTH [85,86]

Alternativamente, la entrada de Ca^{++} a la célula puede ser provocada por la apertura de canales operados por receptor. Si bien hay varios mecanismos que podrían mediar

la apertura de este tipo de canales, en células de glomerulosa existen evidencias que sugerirían la participación de la proteína G. Estos estudios están basados en el efecto inhibitorio de la toxina de Pertussis sobre el influjo de Ca^{++} mediado por A II [87].

La estimulación del infujo de Ca^{++} es más persistente en el tiempo que la respuesta transiente provocada por la liberación intracelular de dicho ión y es dependiente de la ocupación del receptor por el agonista más que de la concentración de Ca^{++} citosólico [88].

La diversidad de mecanismos descritos para la señal de Ca^{++} indica que una compleja red de controles positivos y negativos regulan continuamente la respuesta al agonista.

Activación de la proteína quinasa C (PKC): La enzima PKC pertenece a una familia de proteínas de aproximadamente 80 Kd. Las isoenzimas son codificadas por probablemente seis o siete genes diferentes; además, como resultado del "splicing" alternativo del RNA transcrito surge una gran variedad de isoformas que se expresan específicamente de acuerdo al tejido. Cada miembro de la familia de PKC responde de acuerdo con las concentraciones presentes de Ca^{++} , DAG y otros productos de degradación de fosfolípidos, produciendo varios niveles de activación con respecto a la intensidad y a la duración de la respuesta.

Para activar PKC, DAG aumenta la afinidad de la enzima por el ión Ca^{++} , haciéndola así activa a concentraciones de Ca^{++} del orden de micromolar. Se ha encontrado también que ciertos ácidos grasos *cis*-insaturados (*i.e.* oleico, linoleico, linolénico, araquidónico y docosahexaenoico) modulan positivamente la actividad de la enzima; *i. e.* en presencia de DAG y de ácidos grasos, PKC presenta una actividad casi máxima con concentraciones de Ca^{++} submicromolares.

En presencia de DAG, PKC se une a un ión calcio y a cuatro fosfolípidos, en la membrana plasmática. Así, PKC sufre un cambio en su estructura terciaria, exponiendo su sitio activo [89].

PKC también puede ser activada por proteólisis limitada con calpaína, que resulta en la liberación de un fragmento catalítico completamente activado (forma "M"). La calpaína, que actúa con concentraciones de Ca^{++} del orden de micromolar, es activa en presencia de fosfatidilserina y DAG o ésteres de forbol, indicando que la forma activada de la quinasa es sustrato de la misma. El rol fisiológico de dicha proteólisis no ha sido bien establecido. Estudios realizados con ésteres de forbol mostraron que los mismos provocan una traslocación de la enzima desde el citosol a la membrana seguida de una depleción denominada regulación por disminución ("down-regulation") de PKC. De hecho,

el fragmento M no siempre se recupera en las células y probablemente es degradado por la acción de otras proteasas. Se sugirió entonces que la acción de calpaína está relacionada directamente con el comienzo de la degradación de la enzima [90].

El tratamiento prolongado con ésteres de forbol (*e.g.* PMA) también rinde la forma "M" que es luego degradada. Así, las condiciones de depleción de la actividad de PKC se logran con tratamientos con altas dosis de PMA y/o durante tiempos prolongados (ver capítulo 2). Por otro lado, bajo estas mismas últimas condiciones, PKC sufre una potente traslocación desde el citosol hacia la membrana celular, lo cual provoca que una posterior activación (entendida como traslocación) no sea posible. Este conjunto de hechos (depleción más imposibilidad de una nueva traslocación) llevan a que con altas concentraciones y/o tiempos prolongados de exposición de las células a los ésteres de forbol activos, se produzca desensitización de la quinasa en cuestión.

Varias funciones fisiológicas se asignaron a PKC, estas incluyen su participación en la activación de varias proteínas, secreción y exocitosis, modulación de la conductancia de iones, interacción y desensibilización de receptores, expresión de genes y proliferación celular [91,92]. PKC frecuentemente fosforila las mismas proteínas que PKA, reconociendo los mismos residuos Ser y Tre. No es claro entonces por qué ambas proteínas quinasas ejercen efectos a veces diferentes y a veces similares sobre los procesos bioquímicos dentro de una misma célula activada. Una posibilidad es que el arreglo topológico y la localización celular de las quinasas y de sus proteínas-blanco juegue un papel importante en la determinación de la especificidad de sustrato [91].

Son sustratos de la enzima: NADPH oxidasa [93], citocromo P-450_{SCC} [94], y las ya mencionadas Ca⁺⁺-ATPasa [95], el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ [96] y algunas subunidades de la proteína G [97,57,58].

La participación de PKC en la aldosteronogénesis mediada por algunos agonista *e.g.* ACTH, es aún materia de discusión [98,99]. Estudios realizados con ésteres de forbol demostraron una participación indirecta de PKC sobre la esteroidogénesis en zonas glomerulosa y fasciculata bovinas, mediante la modulación positiva de esta enzima sobre la actividad de adenililciclase [57].

Modificación del potencial de membrana y actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa: Como se mencionó anteriormente, los cambios ocurridos en el potencial de membrana por efecto de un agonista serían unos de los tantos mecanismos involucrados en la regulación de la biosíntesis de ALDO. Un factor importante que formaría parte de este

mecanismo es la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa.

Na^+/K^+ -ATPasa es una bomba electrogénica responsable del mantenimiento de los gradientes de Na^+ y K^+ en las células eucariotas. La misma regula el potencial de membrana en reposo, así como el transporte de H^+ , Ca^{++} , glucosa y una variedad de amino ácidos y aminos biogénicas, dirigidos por el gradiente de Na^+ [100]. En la figura 1.11 se presenta un esquema de la misma. La enzima consiste en un heterodímero conformado por una subunidad α y una subunidad β . En la figura se puede observar la localización de: 1) el sitio de unión a Na^+ , 2) el sitio de unión a K^+ , 3) el sitio de unión al inhibidor ouabaína (ver más adelante), 4) el sitio de fosforilación y 5) el sitio de unión a ATP.

Han sido descritas tres isoformas de la subunidad α en rata [101] y en pollo [102]; ellas son α_1 , α_2 y α_3 . Por otro lado, también se describieron dos isoformas de β (β_1 y β_2). De esta manera, existen varias isoformas de Na^+/K^+ -ATPasa que se expresan diferencialmente en los distintos tejidos [102].

La estequiometría del intercambio Na^+/K^+ corresponde a $3 \text{Na}^+ : 2 \text{K}^+$, resultando, en consecuencia, una diferencia neta de masa y carga transportada en cada ciclo de funcionamiento. La importancia fisiológica que presenta este último punto es doble: por un lado, la actividad de la bomba puede generar una corriente iónica que afecte el potencial de membrana y por el otro, dicha actividad es a su vez voltaje dependiente. En la figura 1.12 se muestra el esquema simplificado de Albers-Post de un ciclo de acción de la bomba. E_1 y E_2 son las conformaciones de la enzima con los sitios de unión al catión ubicados hacia el citoplasma y hacia el espacio extracelular, respectivamente. La traslocación de la carga ocurre entre los estados $\text{P-E}_1\text{-Na}_3$ y la liberación de los iones Na^+ al espacio extracelular. El glicósido cardíaco ouabaína se une solamente al estado E_2 (específicamente al $\text{P-E}_2\text{-Na}_3$, ver [103] y sus ref.).

En membranas de células de glomerulosa ha sido descrita una alta densidad de Na^+/K^+ -ATPasa comparada con membranas de células de fasciculata [104,105], siendo la actividad basal de la bomba mucho mayor en la cápsula adrenal que en el core [47].

Na^+/K^+ -ATPasa está dinámicamente regulada; en general, esta enzima es activada por alteraciones en la concentración de Na^+ intracelular [106,107]. Sin embargo, ha sido descrito que en preparaciones de células intactas los ésteres de forbol y el dibutiril-cAMP (diBu-cAMP) inhiben la actividad de la bomba [108], sugiriendo así que el mecanismo de fosforilación/desfosforilación de la misma regula dicha actividad. Estos estudios fueron confirmados más tarde por ensayos que demostraron que distintas preparaciones de Na^+/K^+ -ATPasa obtenidas de diferentes tejidos disminuyen su actividad cuando son fos-

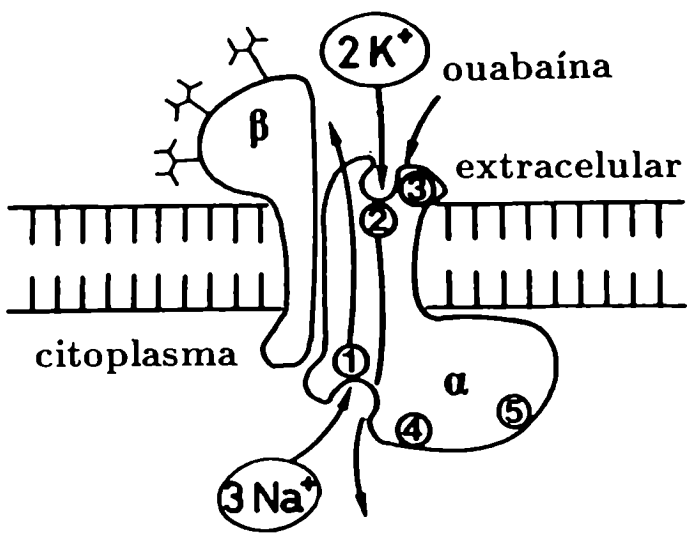


Figura 1.11: Esquema de la estructura de Na^+/K^+ -ATPasa. Un $\alpha\beta$ heterodímero se representa esquemáticamente con los sitios de unión para: 1) Na^+ , 2) K^+ , 3) ouabaina, 4) fosforilación y, 5) ATP.

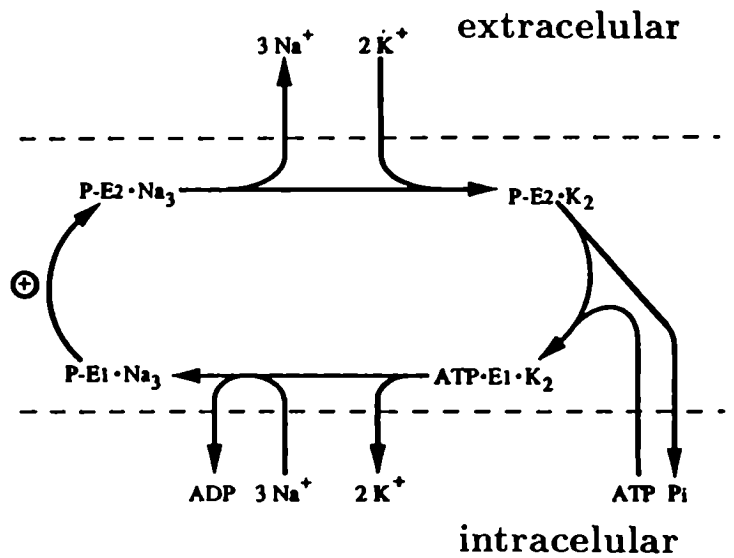


Figura 1.12: Esquema de Albers-Post del ciclo de funcionamiento de Na^+/K^+ -ATPasa. E_1 y E_2 son las conformaciones de la enzima con los sitios de unión al catión hacia el citoplasma y hacia el espacio extracelular, respectivamente.

foriladas tanto por PKA como por PKC [100]. Un número grande de agonistas están asociados con las alteraciones en los niveles de cAMP y DAG, en una amplia variedad de tejidos, sugiriendo que dichos factores también podrían estar regulando la actividad de la bomba; *e.g.* en glándula adrenal ha sido reportado que la actividad de la bomba es inhibida por presencia de A II que, justamente, estimula a PKC [109].

Acción de ouabaína: Los glicósidos cardíacos son compuestos obtenidos de plantas pertenecientes a la familia de los "digitalis". La estructura de estos compuestos es químicamente similar y ellos consisten de un esqueleto de esterol con residuos de azúcares (de 1 a 3) unidos al mismo [110]. Una de las acciones predominantes de estas sustancias es la de estimular la contracción miocárdica, habiéndose postulado también que los mismos podrían jugar un rol importante en la patología de la hipertensión esencial [110]. Ouabaína es un derivado de los "digitalis" que forma parte de este grupo de sustancias (ver su estructura en la figura 1.13). Ouabaína se une a la subunidad α de la Na^+/K^+ -ATPasa, impidiendo la unión del ión K^+ a la misma; esto resulta en una inhibición de la actividad de la bomba [111,112,113].

La acción de los glicósidos cardíacos no se limita sólo al corazón. Debido a la amplia distribución celular de Na^+/K^+ -ATPasa, la presencia de estos inhibidores afecta también el funcionamiento de otros tejidos. Ouabaína provoca contracción del músculo liso vascular y en riñón inhibe la reabsorción de Na^+ , presentando de esta manera efectos natriuréticos [110].

Estudios realizados en la zona glomerulosa adrenal demostraron que ouabaína afecta la producción basal de ALDO y la mediada por ACTH, K^+ y A II. El efecto de ouabaína es bifásico; concentraciones bajas (aproximadamente 10^{-5} M) estimulan la esteroidogénesis mientras que concentraciones mayores la inhiben [114,115]. Este efecto inhibitorio sólo es bloqueado por la presencia de una mayor concentración de K^+ extracelular [115]. Una explicación probable a este evento fue la propuesta de Braley *et al.* quienes sugirieron que un ligero aumento en la relación: $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ intracelular con respecto a la extracelular conduciría a una mayor entrada de Ca^{++} y así a un aumento en la biosíntesis de ALDO [114]. Este aumento se logra por la presencia de dosis bajas de ouabaína o bien por un aumento en la $[\text{K}^+]$ extracelular. Dosis altas de ouabaína producirían un desbalance iónico tal que disminuiría la respuesta celular; este último evento sería revertido incrementando la $[\text{K}^+]$ extracelular.

De Wardener [116] postuló la existencia de una hormona natriurética que actuaría

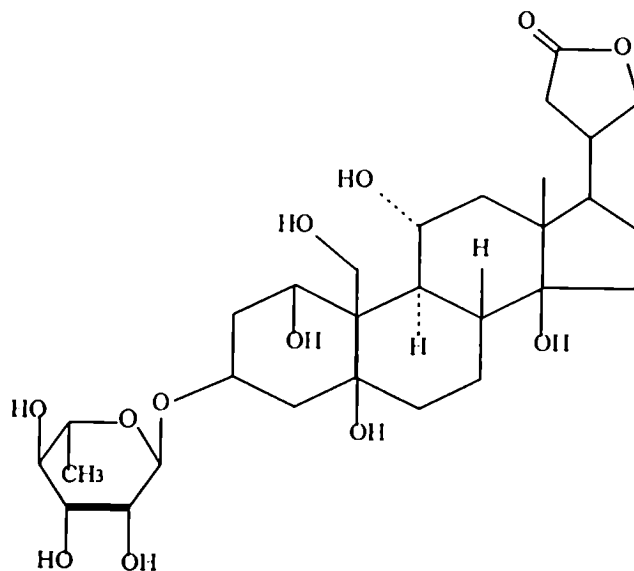


Figura 1.13: Estructura del glicósido ouabaína

inhibiendo la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa renal y que estaría involucrada en la patología de la hipertensión esencial. A mediados de 1991, una serie de publicaciones demostraron la existencia de una sustancia capaz de inhibir Na^+/K^+ -ATPasa purificada de plasma de pacientes hipertensos; esta sustancia presenta una estructura muy similar a ouabaína y un espectro de masa idéntico [117,118,119,120]. El origen de este factor en plasma es, hasta el momento, bastante discutido. Algunos investigadores extrajeron factores “tipo digitalis” de tejido cardíaco [121], otros sugirieron que los mismos eran de origen hipotalámico [122], varios propusieron que dichos factores podrían provenir de la glándula adrenal [123,124,125] basados en el hecho de que en animales adrenalectomizados, los niveles de estos factores se encontraban disminuídos [126,127]. Esta última propuesta es apoyada por un trabajo reciente, donde se realiza una comparación sobre el posible origen de los compuestos tipo-digitalis entre diversos órganos. En ese trabajo se demostró que la concentración de estos compuestos “tipo digitalis”, en plasma y en orina, era aumentada por la presencia de ACTH y disminuída cuando se suministraba dexametasona [128].

Finalmente, la regulación de la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa, ya sea a través de mecanismos que involucren cambios en el potencial de membrana, o bien por medio de

modificaciones sobre la subunidad α de dicha enzima (fosforilaciones o unión de factores tipo-digitalis), juega un rol importante en diversos procesos fisiológicos, entre ellos la homeostasis de Na^+ , el volumen del fluido extracelular y la presión sanguínea.

Interacción entre los diferentes caminos de transducción de señales: La regulación de un proceso fisiológico es la resultante de diversas interacciones producidas entre los diferentes sistemas de transducción de señales. Estas interacciones incluyen la potenciación, la cooperación, el sinergismo y el antagonismo. En el caso particular de la respuesta adrenal se ha mostrado que son varias las vías involucradas en la respuesta biológica. La biosíntesis de esteroides no escapa a ser regulada por una compleja red formada por la intercomunicación entre los distintos sistemas de señales. Un ejemplo de esa comunicación es la homeostasis de Ca^{++} que se mantiene por los procesos de activación de diferentes vías, como la activación de la PKC, las señales dependientes de cAMP, la apertura de canales operados por un receptor y la modificación en el potencial de membrana (éste a su vez regulado por la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa).

El trabajo que aquí se presenta está dirigido específicamente al estudio de la acción y los mecanismos de acción de los péptidos adrenocorticotrofina y endotelina sobre la respuesta adrenal. Se detallan a continuación los antecedentes existentes acerca de la estructura, biosíntesis y función de dichas hormonas.

1.3 Adrenocorticotrofina

Adrenocorticotrofina (ACTH) es un péptido de 39 aminoácidos cuya función principal es la de estimular la corteza adrenal para la síntesis de gluco y mineralocorticoides y andrógenos adrenales. ACTH es sintetizado como parte de un largo precursor molecular de 241 aminoácidos, la proopiomelanocortina (POMC). En la figura 1.14 se muestra un esquema de la estructura de este péptido y de su procesamiento postransduccional. Las modificaciones post-trasduccionales que sufre POMC incluyen la glicosilación, el clivaje enzimático y fosforilación, la acetilación NH_2 -terminal y la amidación terminal de ciertos péptidos. Este procesamiento es específico de cada especie y tejido. En la hipófisis anterior humana POMC es cortado enzimáticamente, resultando predominantemente un péptido que contiene β -lipotrofina (β -LPH) y ACTH y otro péptido con el extremo NH_2 -terminal. En el lóbulo intermedio, ACTH es clivado, dando origen a la hormona α -melanocitoestimulante (ACTH_{1-13}) y a un péptido símil ACTH (ACTH_{18-39}). Por otra parte β -LPH

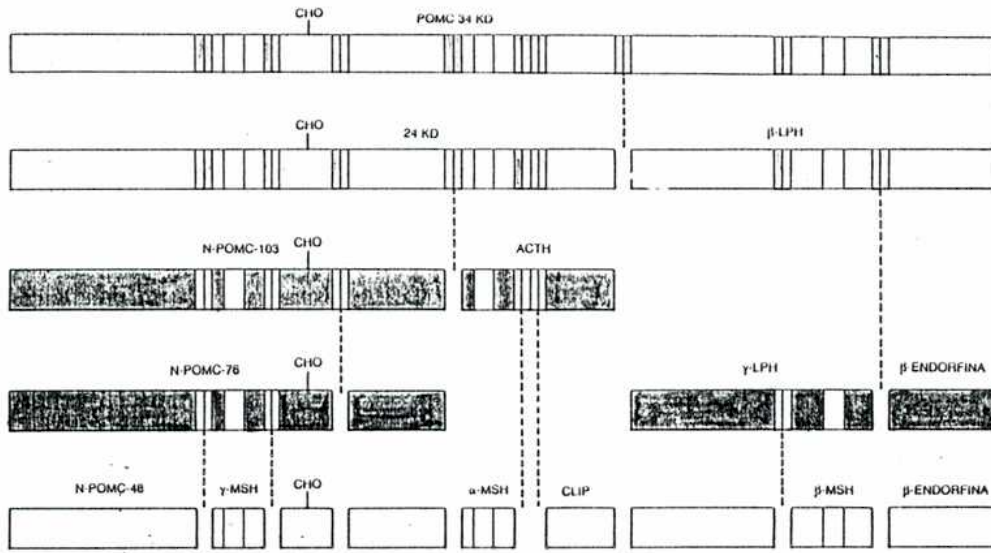


Figura 1.14: Esquema de la estructura y del procesamiento post-transduccional de POMC

da origen a LPH y β -endorfina.

Los primeros 24 aminoácidos de ACTH son los que producen la actividad biológica completa y son idénticos en las diferentes especies. El péptido sintético ACTH₁₋₂₄ posee una larga vida media y es utilizado en la evaluaciones clínicas.

La secreción es controlada por la hormona hipotalámica liberadora de corticotrofina (CRH) (corticotropin-releasing-hormone) y por arginina-vasopresina (AVP). CRH se une a receptores específicos presentes en la célula corticotrófica y, mediante la activación de la vía de la adenililciclasa, provoca la liberación de ACTH y de los péptidos relacionados incrementando también la transcripción del gen de POMC y la síntesis de esa proteína.

AVP es un débil liberador de ACTH pero actúa sinérgicamente con CRH regulando la secreción de la hormona ([129] y sus ref.).

El control negativo se cierra con la retroalimentación que ejercen los glucocorticoides sobre la secreción de CRH, AVP y ACTH. En efecto, los glucocorticoides actúan en múltiples sitios dentro de la célula corticotrófica, *e.g.* inhibiendo la respuesta de ACTH a CRH y bloqueando la transcripción del gen de POMC. Además, ACTH actúa inhibiendo la secreción de CRH vía un mecanismo de retroalimentación negativa [129]. ACTH es

secretado en forma pulsátil y la frecuencia de liberación varía a lo largo del día encontrándose bajo un control circadiano que es regulado por múltiples factores, siendo la luz uno de los más importantes.

Los efectos de ACTH se pueden dividir en dos, según sea la duración del tratamiento, ésto es: efectos agudos y efectos crónicos.

Los efectos agudos de ACTH involucran la estimulación de la biosíntesis de esteroides, ejerciendo su control sobre los siguientes puntos del camino biosintético: a) aumento de la disponibilidad de colesterol y b) activación de los citocromos involucrados en la biosíntesis de esteroides (e.g. P-450_{SCC} y P-450_{11β}).

ACTH facilita la incorporación del sustrato colesterol a las células esteroideogénicas, ya sea aumentando el flujo sanguíneo a la glándula o facilitando el transporte de colesterol a través de membrana plasmática (por ejemplo, incrementando el número de receptores a lipoproteínas presentes en la misma [130]).

Cuando la sangre no aporta suficiente cantidad de colesterol, ACTH estimula la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del esterol.

Por otra parte, en condiciones normales, una parte del colesterol presente en la glándula es utilizado para la esteroideogénesis y sólo una cantidad limitada es reservada en formas de gotas lipídicas. Ante un estímulo agudo de ACTH los reservorios de colesterol son depletados debido a que la hormona activa a la enzima colesterol-ester-hidrolasa [130].

Mediante estudios realizados en presencia de aminoglutetimida (AMG), que bloquea la transformación de colesterol a P₅, se ha observado que ACTH provoca la acumulación de colesterol en la membrana interna mitocondrial [131]. Este hecho es debido a que en presencia de la hormona se induce la síntesis de péptidos que transportan colesterol a través del espacio intermembrana, siendo el más importante fisiológicamente el péptido SAP (steroidogenesis activator peptide) [132,133,134].

Por otro lado, Freeman *et al.* han demostrado, mediante estudios de fraccionamiento subcelular, que ACTH estimula el contacto entre las membranas externa e interna de la mitocondria, colapsando el espacio intermembrana. Este contacto entre ambas membranas sería mediado por algún factor cuya síntesis es inducida por ACTH, ya que este proceso es bloqueado por la presencia de cicloheximida [26].

Así, ACTH regula en forma indirecta el paso temprano de la biosíntesis de esteroides, *i.e.* la actividad del citocromo P-450_{SCC}, ofreciendo una mayor disponibilidad de sustrato a la enzima [135]. En efecto, ha sido comprobado mediante estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) que ACTH acelera la unión del sustrato al citocromo [136].

Por otro lado, ACTH estimula la fosforilación de los citocromos P-450 mitocondriales, favoreciendo así la activación de los mismos. En efecto, varios reportes han demostrado que los citocromos P-450 esteroidogénicos pueden ser fosforilados por PKA y por PKC [94].

De esta manera, en condiciones fisiológicas ACTH es responsable del mantenimiento de la actividad de las enzimas que participan en el paso temprano y tardío del camino biosintético y del incremento de ALDO plasmática luego de un stress agudo [33].

Los efectos crónicos de ACTH incluyen un aumento en la síntesis de los mRNA de los citocromos P-450 mitocondriales y una hiperfunción de la glándula adrenal.

ACTH promueve el crecimiento y diferenciación de las células de fasciculata y reticularis adrenal. Esto es, está involucrada en el mantenimiento del tamaño, la estructura, los componentes enzimáticos y la función secretoria de estas regiones de la glándula.

La administración de ACTH por tiempo prolongado en ratas y humanos provoca una marcada disminución de la secreción de ALDO con respecto a los niveles estimulados observados en los tratamientos agudos [137,23,138]. Este efecto podría ser mediado por una regulación por disminución ("down regulation") [75], o por algún otro mecanismo que dé prioridad a la acción de ACTH sobre la producción de glucocorticoides, inhibiendo la posterior formación de mineralocorticoides [139,140,141,142].

Luego de 3 horas de contacto de las células con ACTH, la biosíntesis de RNA y proteínas se hace evidente. Las nuevas moléculas sintetizadas incluyen enzimas involucradas en la esteroidogénesis y además proteínas receptoras, incrementándose la sensibilidad a la hormona.

Mecanismo de acción de ACTH: Dos poblaciones de sitios receptores a ACTH han sido reportadas en células de glomerulosa y de fasciculata adrenal: sitios de alta afinidad y baja capacidad y sitios de baja afinidad y alta capacidad [143].

La acción de ACTH involucra principalmente la activación de la adenilciclase incrementando el contenido de cAMP intracelular [144,145,146,147,36,148]. Una proteína G, es la intermediaria en la activación, de acuerdo con los estudios de aumento de la producción de ALDO mediados por CT [44].

Varias evidencias indican que segundos mensajeros distintos de cAMP podrían estar también involucrados en el sistema de señal de ACTH [149,150,151,152,153,154,155].

Algunos estudios sugieren que la zona glomerulosa adrenal responde a ACTH a través de uno de los dos receptores presentes, dependiendo de la concentración de hormona utilizada [44]. Concentraciones menores que 10^{-10} M de ACTH estimulan la producción

de ALDO pero no aumentan los niveles de cAMP, lo cual implicaría la presencia de otros segundos mensajeros. Concentraciones altas de ACTH activan la vía de la adenilciclasa mediante la interacción con la otra subpoblación de receptores descripta.

Estudios realizados por el grupo de Rasmussen [44] demostraron que la EC_{50} de ACTH para la producción de ALDO es menor que la necesaria para la producción de cAMP.

Sistemas de señales diferentes al de cAMP también fueron postulados por Li *et al.* [155] quienes encontraron que el péptido ACTH₁₋₂₄ posee la actividad completa y los fragmentos ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄ sólo estimulan parcialmente la producción de cortisol cuando son incubados por separado con células de fasciculata bovina. Además, sólo ACTH₁₋₁₀ es capaz de estimular la biosíntesis de cAMP.

Sin embargo, debido a que la producción de ALDO mediada por bajas dosis de ACTH es mucho menor que la estimulación producida cuando la vía de la adenilciclasa está activa, la significancia fisiológica de la participación de alguna otra vía y su naturaleza es todavía objeto de investigación [23].

El ión Ca^{++} sería uno de los otros factores involucrados en el sistema de transducción de señales de ACTH. En efecto, si bien la concentración de Ca^{++} extracelular no parece ser esencial para la unión de ACTH a su receptor, la presencia de quelantes en el fluido extracelular puede impedir este proceso cuando la concentración de la hormona es baja [145,156,157]. Por otro lado, inhibidores de la acción de calmodulina también bloquean la producción de ALDO mediada por ACTH [158].

ACTH estimula el influjo de Ca^{++} [44]; sin embargo no es claro si ese evento provoca cambios en el contenido de Ca^{++} citosólico [45,159].

El mecanismo por el cual ACTH incrementa el influjo de Ca^{++} no ha sido del todo dilucidado, aunque varias evidencias demostraron que la entrada del ión a la célula es favorecida por la apertura de canales voltaje-dependientes activados por el péptido. En efecto, la presencia de verapamil afecta la aldosteronogénesis mediada por ACTH [160].

Por otro lado, varios reportes han demostrado que ACTH también activa PKC dependiente de Ca^{++} y fosfolípidos en células de glomerulosa y fasciculata adrenal y en la línea celular Y-1 [75,161,94,162,163,164]. Cozza *et al.* demostraron que ACTH incrementa el contenido de DAG y estimula la traslocación de PKC de citosol a membrana en cultivo de células de glomerulosa de ternero [161].

Por último, datos acumulados de diversos reportes indican que PKC y, en algunos aspectos Ca^{++} , actúan principalmente modulando la producción de cAMP [44,58,165,57].

Finalmente, a partir de los antecedentes acumulados hasta el momento se desprende

que otra vía, alternativa y/o moduladora de la vía de la adenililciclasa, participaría de la aldosteronogénesis mediada por ACTH, aunque, al momento, se desconoce por completo su lugar de acción.

En este trabajo se ha pretendido avanzar sobre estos últimos puntos.

1.4 Endotelina

El endotelio vascular está compuesto por una continua monocapa de células endoteliales ubicada entre el torrente sanguíneo y el músculo liso vascular y juega un rol importante en la modulación del tono vasomotor. En efecto, varios factores vasoconstrictores de origen nervioso y humoral no ejercen su efecto si el vaso sanguíneo ha perdido su endotelio. Esto sugirió la existencia de alguna sustancia secretada por las células endoteliales que mediaría la disminución del diámetro vascular producida por aquellos factores. Antes de presentar las características de tal sustancia mediadora, se describirán algunos aspectos de la fisiopatología de la presión arterial.

Presión arterial: El corazón se compone de dos bombas en serie: una sirve para propeler sangre hacia los pulmones (circulación pulmonar), y la otra sirve para enviar sangre al resto de los tejidos (circulación sistémica). El corazón expulsa sangre con un flujo unidireccional, en forma intermitente. Sin embargo, gracias a la distensión de la arteria aorta y de sus ramas durante la contracción ventricular (sístole), y al retroceso elástico de las arterias grandes, con propulsión de la sangre hacia adelante durante la relajación ventricular (diástole), se logra un flujo continuo hacia la periferia.

La presión arterial media es la presión promedio de un ciclo cardíaco que existe en la aorta y en sus ramas mayores. Se definen presiones arteriales sistólica y diastólica como los límites superior e inferior de las oscilaciones periódicas que ocurren en la presión arterial.

Los determinantes de la presión arterial pueden dividirse en factores físicos y fisiológicos. Por razones de simplicidad el sistema arterial se considera como un sistema estático, elástico y los dos únicos factores físicos a tener en cuenta son el volumen de sangre dentro del sistema arterial y las características elásticas de dicho sistema. Se consideran factores fisiológicos a: la frecuencia cardíaca, el volumen minuto, el volumen expulsado por el corazón y la resistencia periférica. Sin embargo, todos estos factores fisiológicos operan a través de uno o ambos factores físicos.

El volumen arterial, a su vez depende de la velocidad de influjo de sangre desde el

corazón a las arterias y de la velocidad de flujo desde las arterias a los capilares. Por lo tanto, si el influjo arterial excede al flujo, entonces el volumen arterial aumenta, las paredes arteriales se estiran más y la presión se incrementa.

La estructura de la pared de los vasos, desde el corazón a la periferia, pasa de ser predominantemente elástica, a nivel de la arteria aorta, a cada vez más muscularizada (arterias periféricas). Las arteriolas son los principales puntos de resistencia al flujo sanguíneo, y por lo tanto son importantes para el mantenimiento de la presión arterial. Las paredes de estos vasos están constituidas principalmente por fibras musculares lisas. El músculo liso vascular es el tejido responsable del control de la resistencia periférica total, del tono arterial y venoso, y de la distribución del flujo sanguíneo a través del cuerpo.

La presión arterial se encuentra dentro de un rango relativamente estrecho en un individuo normal. El control de la misma está dado principalmente por el sistema nervioso autónomo y por los barorreceptores. Sin embargo, desde un punto de vista a largo plazo, el control del balance de líquidos por el riñón, por la corteza adrenal y por el sistema nervioso central, con el mantenimiento del volumen de sangre constante, es de mayor importancia.

De esta manera, todos aquellos factores involucrados en el control del balance de líquidos por un lado, y del diámetro y elasticidad de los vasos sanguíneos por el otro, afectan notablemente la presión arterial.

Es de hacer notar que la mayoría de las hormonas con receptores específicos en las células musculares de los vasos sanguíneos, y que tienen como función modular el diámetro de los mismos, como vasodilatadores y vasoconstrictores, también tienen receptores específicos en las células de la glomerulosa adrenal donde modulan la producción de ALDO, como inhibidores o activadores respectivamente; tal es el caso de A II, vasopresina, ANP, BNP, agonistas β -adrenérgicos, etc.

Estructura y biosíntesis de endotelina: Muchas investigaciones realizadas en los últimos 15 años confirmaron que los productos vasoactivos secretados por las células endoteliales son potentes moduladores de la contractibilidad del músculo liso vascular [166]. Hickey *et al.* [167] reportaron el descubrimiento y la caracterización de un péptido estable con una potente actividad vasoconstrictora, secretado por las células endoteliales, que originalmente fue llamado endotensina o factor constrictor derivado del endotelio (EDCF). Luego en 1987, mediante varios estudios de confirmación, el péptido fue purificado, clonado su cDNA y renombrado como Endotelina (ET) [168,169,170].

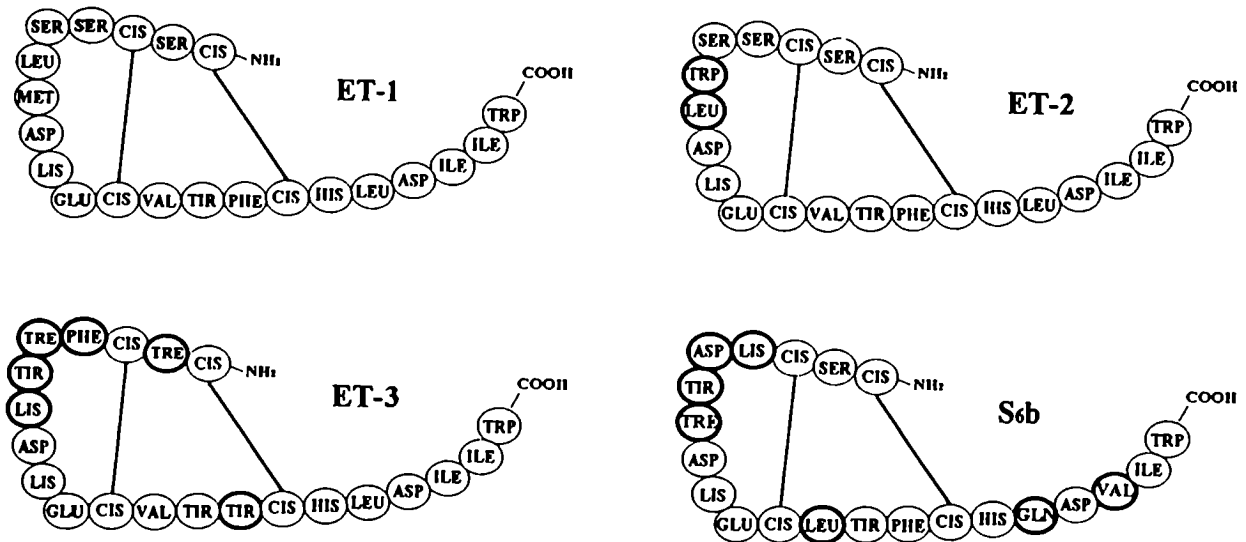


Figura 1.15: Estructuras de las endotelinas 1, 2 y 3 y de la sarafotoxina S_{6b}.

ET es un péptido compuesto por 21 aminoácidos; su peso molecular se estimó en 2492 a partir de su secuencia aminoacídica [171,172,173]. De acuerdo con el análisis del genoma humano, ET presenta al menos tres isoformas codificadas por tres genes diferentes: ET-1, ET-2 y ET-3 (ver figura 1.15). ET-1 es la única isoforma producida y liberada por las células endoteliales [166]. Ha sido descrito también un cuarto isopéptido, ET- β presente en el genoma de ratón y que se ha denominado péptido constrictor vasointestinal (VIC), debido a su expresión en intestino [174].

Cada una de las isoformas de endotelina contiene cuatro residuos cisteína que forman dos puentes disulfuro intracatenarios (entre las posiciones 1-15 y 3-11) y el extremo COOH-terminal presenta características hidrofóbicas (residuos 16-21) (ver [175] y sus ref.). Mediante el análisis de la estructura terciaria de ET [176] y de experimentos de modificación o deleción de ciertos aminoácidos [177,176] se concluyó que tanto el extremo COOH-terminal como la configuración en forma de rulo que presenta el péptido, son esenciales para la bioactividad del mismo. ET-2 contiene 2 aminoácidos diferentes a ET-1 (90% de secuencia homóloga), mientras que ET-3 presenta 6 aminoácidos diferentes a ET-1 (71% de secuencia homóloga). Esa diferencia en la secuencia se relaciona con el po-

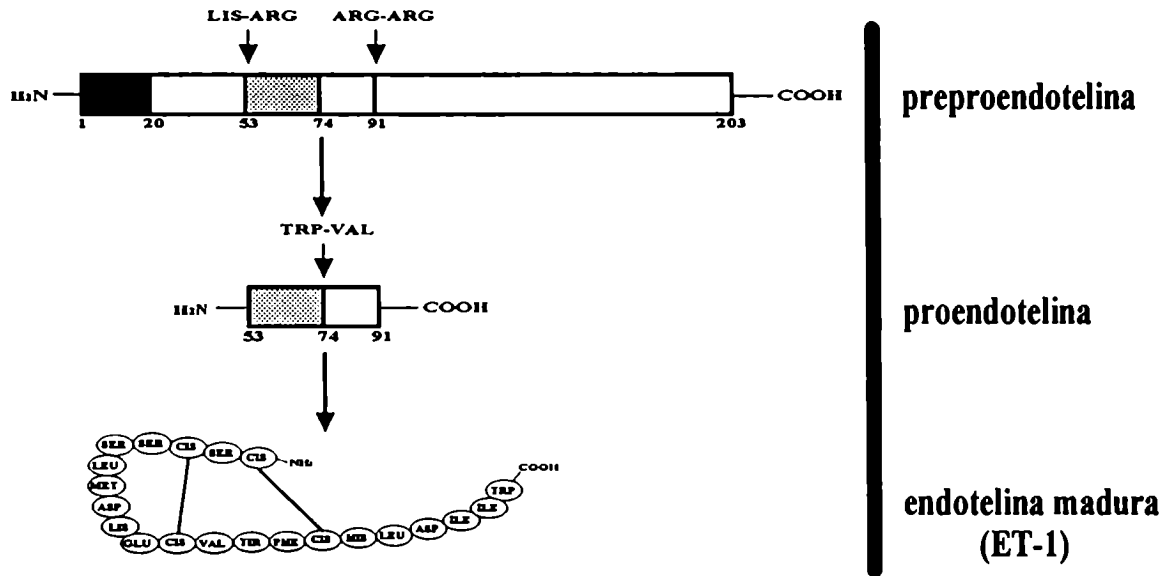


Figura 1.16: Procesamiento proteolítico de la preproendotelina

der vasoconstrictor; ET-1 y ET-2 presentan actividades vasopresoras similares mientras que ET-3 es notablemente menos potente [171].

Por otro lado, ET muestra una homología estructural y funcional con las sarafotoxinas (ver estructura en la figura 1.15), un grupo de péptidos derivados del veneno de la serpiente *Atractaspis engaddensis* [178]. Tanto las uniones disulfuro como el extremo COOH-terminal hidrofóbico están presentes en las endotelinas y en las sarafotoxinas, sugiriendo que ambas familias podrían estar relacionadas a través de un origen evolutivo común [179]. Las sarafotoxinas, por su homología estructural se unen a los receptores de ET, siendo las más activas las sarafotoxinas S₆b y S₆c.

Los isopéptidos de ET se forman como resultado de un procesamiento proteolítico de una prohormona; en la figura 1.16 se muestra un esquema del mismo. Las células endoteliales sintetizan la preproendotelina de 203 aminoácidos que es cortada proteolíticamente para formar "big ET" (39 aminoácidos); luego, por acción de una proteasa específica que corta la secuencia Trp-Val se produce el péptido maduro de 21 aminoácidos.

Con respecto a la regulación génica de ET se han observado incrementos inmediatos en la producción del mRNA de la preproET luego del tratamiento de cultivos de célu-

las endoteliales con ionomicina, ésteres de forbol, trombina y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) [180,181,173].

Algunas funciones de ET: ET es el vasoconstrictor endógeno más potente caracterizado hasta la fecha; ejerce su acción en la vasculatura renal, mesentérica y pulmonar [175].

Además, se han descrito otras acciones de ET, como por ejemplo: incrementar los niveles plasmáticos del péptido natriurético atrial (ANP), vasopresina, renina, norepinefrina, epinefrina y aldosterona [180]. Además, ET estimula la mitogénesis en diferentes tipos celulares (en particular en células mesangiales [182]), la síntesis de DNA en células de músculo liso vascular y la expresión de proto-oncogenes (*c-jun*, *c-fos*) [183].

El rol de ET como sustancia endócrina ha sido cuestionado, sugiriéndosele un papel parácrino o autócrino más que el de una hormona circulante. Esto se debe a que los niveles de ET inmunoreactiva en condiciones normales son muy bajos (< 5 pM), comparados con su EC₅₀ determinado para contraer músculo liso aislado (100 pM) [166]. De esta manera, la capacidad de las células blanco de responder a ET probablemente no depende de los niveles circulantes del péptido sino de su síntesis y secreción local.

Esta acción paracrina está de acuerdo con el hecho que la célula que secreta ET-1 (endotelial) está al lado de la célula sobre la que tiene que actuar. Por ejemplo, en el riñón, como en otros órganos, la localización anatómica de las células productoras de ET, es quizás el factor determinante de la concentración local del péptido [184]. Por otro lado, la acción autócrina del péptido sería obvia por la presencia de receptores en las mismas células endoteliales.

Sin embargo en algunos estados patológicos, los niveles de ET en circulación son tan elevados, que su acción podría adquirir un mayor significado biológico [185,186]; así, se ha especulado sobre su participación en hipertensión, vasoespasmos coronarios y cerebrales y en otros desórdenes vaso-oclusivos [166].

Mediante estudios autorradiográficos utilizando [¹²⁵I]-ET-1 se ha demostrado la existencia de receptores específicos a ET en varios sistemas diferentes del músculo liso vascular [187,188], *e.g.* en hipotálamo e hipófisis [189], en cerebro [190] y en riñón [184].

En particular, en la glándula adrenal se observó una localización preferencial en la zona glomerulosa [191,192,187,188,193] presentando dichos receptores una distribución similar a la de los receptores de ANP [188].

Mediante estudios de clonado molecular se ha encontrado que los receptores a ET pertenecen a la familia de receptores acoplados a una proteína G, existiendo al menos

dos subtipos: las isoformas ET_A y ET_B [194,195]. Los receptores ET_A presentan una afinidad selectiva por ET-1 y ET-2 y sus mRNA se hallan ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, corazón y pulmón [194]. El subtipo ET_B muestra una afinidad equivalente por las tres ET y por todas las sarafotoxinas y su mRNA no ha sido encontrado en células del sistema muscular vascular [195], postulándose que se hallan en la misma célula endotelial (efecto parácrino).

Por otro lado, se han descrito en sistema nervioso central, receptores a ET-3 denominados de super alta afinidad dado que la afinidad de los mismos por ET es aproximadamente 10 pM [196].

Estudios realizados en cultivo de células de glomerulosa de ternero demostraron la presencia de ambas subpoblaciones de receptores, (un 80% de los receptores ET_A y un 20% de los ET_B [192]).

El mecanismo de transducción de señales de ET ha sido estudiado en varios sistemas celulares, principalmente en músculo liso vascular [172,197,198,199,200]. ET-1 provoca un incremento de la $[Ca^{++}]_i$, dependiendo de la dosis. Este incremento se presenta en dos fases que resultan de la activación de diferentes caminos de señales: un aumento rápido y transiente (dentro de los primeros segundos), seguido por una disminución suave hasta alcanzar un estado estacionario superior al basal que se mantiene hasta los 15 minutos [166].

Varios reportes ha demostrado que ambas subpoblaciones de receptores a ET, los receptores ET_A y ET_B , están funcionalmente acoplados a una PLC vía una proteína G_q en el sistema muscular vascular (los receptores ET_A) y en células endoteliales (los receptores ET_B) [201,202,203]. En efecto, la presencia de toxina de Pertussis disminuye el efecto vasoconstrictor producido por ET-1 (ver [166] y sus ref.).

Como consecuencia de la activación de los receptores ET_A en sistema muscular vascular, se produce la hidrólisis de fosfolípidos, liberándose DAG e IP_3 [197,198], para luego activar a PKC e incrementar los niveles de calcio citosólico por liberación del ión de los depósitos intracelulares.

En respuesta a ET, el pico inicial de la $[Ca^{++}]_i$ inicia probablemente una serie de procesos dependientes de dicho ión (*e.g.* mayor eflujo de Ca^{++} como respuesta a un aumento intracelular o bien una transiente hiperpolarización de la membrana mediada por canales de K^+ activados por Ca^{++}). Luego de ese eflujo neto, ET provoca un incremento de la concentración de dicho ión a través del influjo del mismo por canales votaje dependientes y/o canales operados por receptor; sin embargo, poco se sabe si el mecanismo de acción

de ET es directo o a través de algún segundo mensajero (ver [166] y sus ref.).

Por otro lado, un trabajo reciente ha demostrado que además de la activación de PLC, ambos tipos de receptores a ET estarían acoplados a la adenililciclase vía proteínas G diferentes. Así, la activación de los receptores ET_A presentes en músculo liso vascular produciría un aumento en los niveles de cAMP y por otra parte, la acción de ET-3 sobre células endoteliales provoca una inhibición de la formación de cAMP mediada por forskolina [204].

En resumen, del estudio del mecanismo de señales de ET en el sistema muscular vascular (el sistema más estudiado hasta el momento) se deduce que este péptido produce, principalmente, cambios en la dinámica del ión Ca^{++} , así como la activación de la vía de PKC.

En este trabajo se estudian los sistemas de señales y subpoblaciones de receptores involucrados en algunas de las acciones de ET-1 en la glándula adrenal.

1.5 Objetivos

Como se mencionó anteriormente, distintos factores estarían involucrados en el control de la actividad de cada uno o de ambos citocromos mitocondriales que participan en la biosíntesis de ALDO. La acción de dichos factores sería mediada por uno o varios sistemas de transducción señales. El objetivo de este trabajo es avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de alguno de estos factores, específicamente ACTH, incorporar sólidamente a ET a la lista de reguladores de la producción de ALDO y estudiar la relación que pueda existir entre ambos.

De acuerdo con lo descrito en la sección 1.3, es bien conocido que el efecto de ACTH sobre la respuesta adrenal es mediado por un incremento en los niveles de cAMP. Sin embargo, hay varias evidencias que indican que otros segundos mensajeros podrían estar involucrados en el sistema de señales de ACTH. Este trabajo propone entonces analizar la existencia de vías alternativas y/o modulatorias de la vía de cAMP en el mecanismo de acción de dicha hormona. El estudio estuvo enfocado principalmente en determinar, mediante la utilización de inhibidores específicos, la posible participación de quinasas diferentes a PKA en la respuesta adrenal mediada por ACTH. Los putativos mecanismos de señales propuestos por varios investigadores son: a) un incremento del influjo del catión calcio y b) la activación de PKC (ver detalles en la sección 1.3), aunque nada ha sido propuesto sobre su lugar de acción. Mediante el uso de estimuladores de dichos

eventos, se buscaron evidencias que esclarezcan la identificación de la(s) probable(s) vía(s) alternativa(s) y su acción específica.

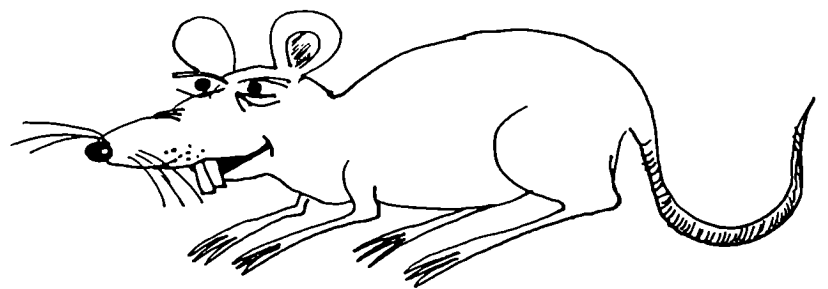
Por otro lado, de acuerdo con los estudios de distintos investigadores, en especies animales diferentes a la rata, en los que demostraron la existencia de receptores específicos para ET en corteza adrenal y efectos de dicho péptido como regulador de la función renal, en este trabajo se pretende demostrar la capacidad aldosteronogénica de ET en rata y dilucidar los distintos pasos mecanísticos que conllevan a un aumento en la esteroideogénesis mediada por el péptido.

Por medio de estudios realizados *in vitro*, apoyados por experimentos *in vivo* —a fin de asegurar la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos—, se trató de identificar los posibles segundos mensajeros involucrados en la respuesta biológica a ET y las actividades enzimáticas reguladas por dicho péptido.

Finalmente, resulta de sumo interés analizar la contribución que ACTH y ET-1 pudieran ejercer en forma conjunta sobre la respuesta adrenal. En efecto, dado que la biosíntesis de ALDO es la resultante de la interacción de diversos factores, la acción que un determinado agente pudiera producir sobre el estímulo provocado por otro ayudaría a visualizar los lazos que conforman esta complicada red que conduce a una respuesta determinada. Con el objeto de estudiar la interrelación entre la acción aldosteronogénica de ambos péptidos se realizaron experimentos, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, y se determinó la respuesta observada en presencia de ambos agentes, comparándola con las acciones ejercidas por cada agente en forma individual.

Capítulo 2

Diseño Experimental



2.1 Animales

Se utilizaron ratas machos, cuyo peso osciló entre 200 g y 300 g, de las cepas chbb-Thom, Sprague Dawley, Dahl sensibles a dieta con sal (SS/jr) y resistentes a dieta con sal (SR/jr). Las dos últimas cepas mencionadas son derivadas de la cepa Sprague Dawley. SS es sensible a inducir hipertensión por dieta con alto contenido de Na^+ presentando, bajo esa condición, una presión arterial media superior a la normal; SR es resistente, en cambio, a dicha dieta.

Los animales se criaron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a una temperatura constante de 25°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; la dieta y el agua de bebida se suministraron *ad-libitum*.

2.2 Estudios *in vivo*

Los ensayos *in vivo* están enfocados, principalmente, al estudio de los efectos de endotelina-1 (ET-1) sobre la respuesta adrenal. Dichos efectos se compararon con los producidos por otros agentes estimuladores clásicos como angiotensina II (A II) y adrenocorticotrofina (ACTH).

En esta sección se detalla el procedimiento llevado a cabo en estos ensayos. Básicamente, la estrategia consistió en infundir los diferentes agentes estimuladores a animales previamente anestesiados, en presencia o ausencia de sustancias que interaccionen con dichos estímulos. Las respuestas determinadas fueron, principalmente: la biosíntesis de aldosterona (ALDO) y corticosterona (B), la incorporación de colesterol a las glándulas adrenales, la actividad de enzimas esteroideogénicas como los citocromos P-450_{sc} — que escinde la cadena lateral del colesterol para transformarlo en pregnenolona (P₅)— y P-450-(11 β ,18)-hidroxilasa/aldosintetasa (P-450_{11 β}) [20,17] y la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa.

2.2.1 Preparación de los Animales para las Infusiones

Los animales se anestesiaron con tiopental sódico *i.p.* en una dosis equivalente a 60 mg/Kg de peso corporal.

Luego, los animales se traqueotomizaron para permitirles, así, una mejor respiración eliminándose obstrucciones de los conductos aéreos producidos por posibles secreciones

provocadas por la anestesia. La traqueotomía se llevó a cabo produciendo una incisión en la tráquea, colocando una cánula de Silastix y sujetando la misma a la porción inferior de la tráquea con hilo de sutura. Las secreciones se eliminaron aspirando el líquido retenido en el interior del tubo de Silastix con una cánula de diámetro menor, conectada a una trampa de agua.

Las sustancias a estudiar se infundieron a través de un cateter colocado en la vena *yugular*. La técnica quirúrgica utilizada fue descrita en [205]. Para ello, se practicó una incisión en la región supraclavicular izquierda. El tejido se divulsionó hasta localizar la vena *yugular*, separando, a continuación, el tejido conectivo adherido a la misma. La porción superior de la vena se bloqueó, colapsando la misma con hilo de sutura. De esta manera, se evitó que la sangre de retorno fluya hacia el exterior en el momento de realizar el corte. La cánula se introdujo en la vena y se ajustó con hilo de sutura.

La colección de muestras de sangre se realizó a través de un cateter, previamente heparinizado, colocado en la arteria carótida. La canulación de la arteria se realizó según la técnica descrita en [205], siendo el detalle de este procedimiento quirúrgico similar al realizado para canular la vena *yugular*.

La colección de orina se hizo a través de un cateter colocado en la vejiga urinaria. Para llevar a cabo este procedimiento, se realizó una incisión en la porción inferior del abdomen hasta acceder a la cavidad general. Una vez localizada la vejiga, se eliminó el líquido retenido en la misma y se la cauterizó. La cánula se introdujo a través de la porción de vejiga cauterizada y se la sujetó a la misma con hilo de sutura.

Luego del tratamiento quirúrgico, los animales se dejaron durante 15 minutos para permitir, así, su estabilización.

2.2.2 Sustancias Infundidas: Elección de las Dosis

Las dosis utilizadas fueron determinadas por experimentos previos u obtenidas a partir de la bibliografía, comprobando experimentalmente que produzcan los efectos buscados.

Las soluciones stock se almacenaron a -20°C y se disolvieron en vehículos apropiados justo antes de realizar los experimentos.

El protocolo general de infusión se describe más adelante y se muestra en la figura 2.1.

Adrenocorticotrofina (ACTH): Se utilizó el péptido Cortrosyn de Organon (ACTH_{1-24}), preparado en una solución stock $50\ \mu\text{M}$ en CH_3COOH 0.15%. ACTH se infundió a razón de $280\ \text{ng} \cdot (\text{Kg. de peso corporal})^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$.

Aminoglutetimida (AMG): Se utilizó una solución stock 50 mg/ml de AMG de Sigma Chemicals disuelta en una solución de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$, 10 mM, de pH = 6.7. Una dosis de 50 mg/Kg. de peso corporal se inyectó *s.c.* en el momento de iniciar la infusión. Esta dosis de AMG produce un 86% de inhibición de la biosíntesis de pregnenolona de acuerdo con lo descripto por Dexter *et al.* [206]. Ese valor fue comprobado en el laboratorio, obteniéndose un resultado similar.

Angiotensinas I y II (A I y A II): Se utilizaron los péptidos sintéticos humanos de Sigma Chemicals, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu (A I) y Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (A II) preparados en una solución stock 20 μM en CH_3COOH 0.15% v/v. La dosis está de acuerdo con datos obtenidos de la bibliografía [207,208,209,210,211]. La misma correspondió a un valor de 300 ng.(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min. $^{-1}$ para A I y a un valor de 40 ng.(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min. $^{-1}$ para A II.

BQ-123: Se utilizó Cyclo(D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp) de Peptides International como bloqueante de la subpoblación de receptores ET_A [201], disuelto a una concentración de 200 mg/ml en CH_3COOH 0.15% v/v. BQ-123 se infundió desde tiempo cero a razón de 200 ng.(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min. $^{-1}$. Esta dosis se mantuvo hasta el final de la infusión.

Enalapril: Se utilizó el inhibidor de la enzima convertidora de A I a A II de Merck-Sharp and Dhome.¹ La dosis se eligió de acuerdo a datos de bibliografía [212] y por sugerencia de la empresa fabricante [213]. De todos modos, la efectividad de enalapril a la dosis utilizada fue comprobada experimentalmente (ver capítulo 4). Enalapril se suministró, durante los primeros 30 minutos de la infusión, a razón de 1.32 μg .(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min. $^{-1}$ y, luego, durante los segundos 45 minutos, la dosis disminuyó a 440 ng.(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min. $^{-1}$.

Endotelina: Se utilizó la secuencia sintética de ET humana-porcina (ET-1), de Sigma Chemicals. El péptido se almacenó en una solución 0.1 mg/ml en CH_3COOH 0.15% v/v. La elección de la dosis se realizó de acuerdo con datos obtenidos de la bibliografía [212,214,215,216] y mediante experimentos que permitieron trazar curvas de producción de ALDO en función de la dosis suministrada. Las dosis fueron empleadas en un rango que

¹Enalapril fue cedido gentilmente por el Dr. J.C. Descalzo de Merck-Sharp and Dhome, Argentina

varió entre 20 y 110 ng.(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹. Como se muestra en el capítulo 4, la infusión de 80 ng.(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ provocó la respuesta máxima en la producción de ALDO. A partir de ese resultado, se decidió infundir esta dosis en los experimentos sucesivos (ver capítulo 4).

H₇: Se utilizó 1-(5-Isoquinolinilsulfonil)2-Metil Piperazina (H₇) de Sigma Chemicals [217], preparado en una solución stock 10 mM en solución fisiológica. H₇ se infundió a razón de 5 mg.(Kg. de peso corporal)⁻¹.min.⁻¹.

Sarafotoxina (S_{6b}): Se utilizó la secuencia sintética de la toxina producida por la serpiente *Atractaspis engaddensis* de Sigma Chemicals, preparada en una solución stock de 0.2 mg/ml en CH₃COOH 0.15% v/v. La dosis seleccionada para las infusiones con S_{6b} fue igual a la utilizada para infundir ET-1. Esta decisión se tomó con el objeto de comparar la potencia de ambas sustancias, dado que presentan homología estructural y funcional [196,178] (ver capítulo 1).

Verapamil: Se utilizó cloruro de verapamil de Sigma Chemicals; la droga se infundió a razón de 160 μg.(Kg. de peso corporal)⁻¹.min.⁻¹, disuelta en solución fisiológica [218].

Flujos de infusión utilizados: Otro parámetro que se tuvo en cuenta para llevar a cabo los ensayos *in vivo* fue el flujo de infusión, dado que los efectos producidos por las distintas sustancias infundidas podrían depender de la carga de Na⁺, la volemia y el flujo sanguíneo, y así del flujo utilizado.

Los experimentos se realizaron infundiendo dosis fijas de ET-1 a tres flujos distintos: 50, 125 y 180 μl/min. El flujo de infusión correspondiente a 125 μl/min. provocó la respuesta máxima en la producción de ALDO, eligiéndose este flujo como óptimo para llevar a cabo los experimentos posteriores (ver capítulo 4).

2.2.3 Protocolo de Infusión

El protocolo de infusión se diseñó de manera tal de elegir períodos óptimos para lograr la respuesta máxima a los agentes infundidos. El mismo se encuentra esquematizado en la figura 2.1. Durante los primeros 30 minutos se infundió solución fisiológica (*i.e.* NaCl 0.9 %) a un flujo adecuado (ver sección 2.2.2). Luego, se tomaron muestras de sangre para la determinación de un primer hematocrito (Hc₁).

La orina se colectó durante los últimos 15 minutos de esta primera infusión y se midió el volumen colectado (VU_1). Durante los siguientes 45 minutos se suministró, según el ensayo, solución fisiológica (control) o los distintos agentes estimulantes de la biosíntesis de esteroides. Nuevamente, durante los últimos 15 minutos de esta segunda etapa de infusión, se colectó orina y se midió su volumen (VU_2). Al finalizar la infusión, se tomaron muestras de sangre para la determinación del segundo hematocrito (Hc_2).

En aquellos ensayos donde se utilizaron posibles bloqueantes de los efectos de los agentes estimuladores de la respuesta adrenal (*e.g.* BQ-123, Enalapril, Verapamil, etc.); dichos bloqueantes se suministraron desde el comienzo de la infusión, continuando hasta finalizar la misma (ver figura 2.1).

Finalizadas las infusiones, se practicó una incisión sobre el abdomen de cada animal hasta entrar en la cavidad general y se disectaron, según correspondiese, distintos órganos: glándulas adrenales, hígado, testículo, músculo liso vascular proveniente de la arteria aorta, bazo, pulmones, riñones y cerebro. Los animales murieron como consecuencia de la técnica quirúrgica, o se provocó su muerte al finalizar la misma por colapso pulmonar.

2.2.4 Determinación del Hematocrito y Medición de la Presión Arterial Media

Los cambios producidos en la presión arterial media y en el hematocrito, debido a las infusiones con ET-1, fueron empleados como parámetros de vasoconstricción.

Presión Media Arterial ²: En estos ensayos en particular, los animales fueron anestesiados por inhalación utilizando para ello un equipo de Ohio Med. Los animales se indujeron con 5% de isoflurano en oxígeno y se mantuvo un nivel de isoflurano de 2.5% durante la implantación de las sondas y entre 1.5 y 2% durante el experimento propiamente dicho. Ante la primer manifestación de dolor y/o ansiedad, que se determinaban por un aumento en la presión o el pulso, el porcentaje de anestesia era aumentado ligeramente.

La presión se registró colocando una sonda de polietileno PE-50 en la arteria femoral con un transductor de desplazamiento mínimo, modelo Century CP-02 (Century Technology Comp. Inglewood, CA), conectado a un fisiógrafo modelo Grass 7D Polygraph

²Las determinaciones de presión arterial media fueron realizadas en el Lab. del Dr. C.E. Gómez-Sánchez, Dep. of Internal Medicine, College of Medicine, Univ. of South Florida and James A. Haley Veterans Hosp. Tampa, Fl., USA.

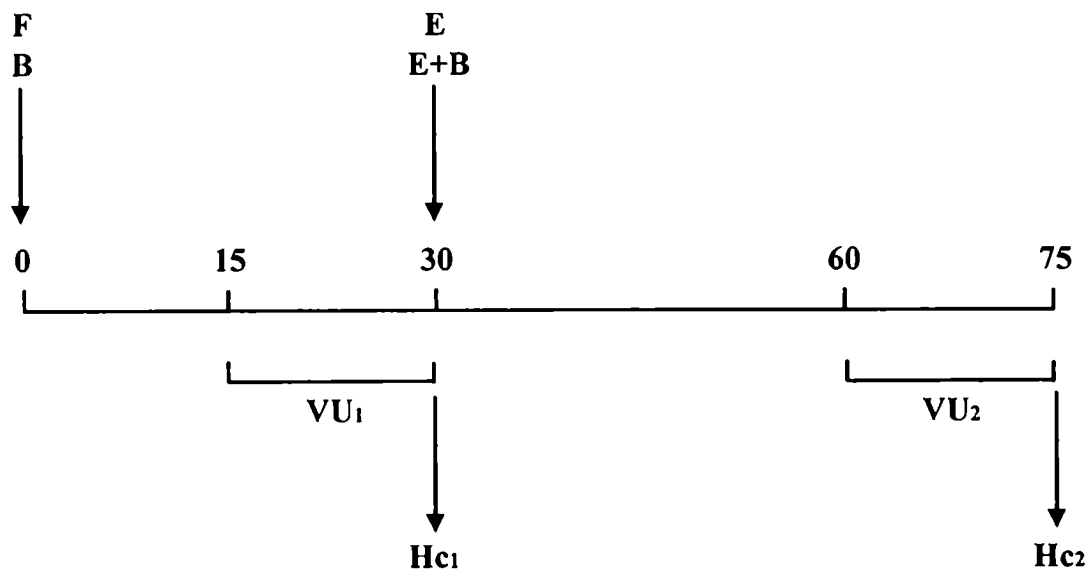


Figura 2.1: Esquema de infusión

F: infusión de solución fisiológica. B: infusión de bloqueantes de la activación. E: infusión de estimuladores. E + B: infusión de estimuladores más bloqueantes de la activación. VU₁ y VU₂: volúmenes urinarios 1 y 2 respectivamente. Hc₁ y Hc₂: Hematocrito 1 y 2 respectivamente.

(Quincy, M.A.). Los cambios en la presión arterial fueron registrados cada 5 minutos durante el desarrollo de las infusiones. Los valores se expresan como porcentaje de cambio registrado con respecto a la presión inicial, definiéndose como presión arterial inicial al valor estable registrado luego de 15 minutos de haber colocado las sondas, *i. e.* a partir del momento en el cual se iniciaron las infusiones.

Hematocrito: La determinación se realizó a partir de muestras de sangre arterial colectadas en tubos capilares de 10 cm de longitud, previamente heparinizados. Para ello, los capilares se centrifugaron a 2000 g, durante 30 minutos, en una centrífuga clínica de mesa y luego se midieron las alturas correspondientes con un calibre. Los resultados obtenidos se expresaron como cocientes entre el hematocrito obtenido en la segunda etapa de la infusión (Hc_2) y el hematocrito obtenido en la primera etapa de infusión (Hc_1), *i. e.* Hc_2/Hc_1 (ver figura 2.1).

2.2.5 Soluciones Buffers Utilizadas

La composición de las soluciones buffers utilizadas, para realizar los homogenatos de los diferentes tejidos varió según la actividad enzimática que se ensayara una vez finalizadas las infusiones. Independientemente de estas condiciones, la solución buffer básica que se utilizó fue TRIS-HCl, de pH = 7.4.

Los homogenatos preparados para determinar las actividades de las enzimas citocromo P-450_{SCC} y citocromo P-450_{11 β} se prepararon en buffer TRIS-HCl 20 mM conteniendo: sacarosa 25 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 0.5 mM y glucosa 1 mg/ml.

Por otro lado, los homogenatos preparados para determinar la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa se realizaron en buffer TRIS-HCl 125 mM conteniendo EDTA 1 mM.

2.2.6 Preparación de los Homogenatos de los Distintos Tejidos

Se prepararon homogenatos de diferentes órganos a fin de realizar distintas mediciones, entre ellas, la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa, el contenido de colesterol y la medición de esteroides.

Los órganos se extrajeron y se colocaron sobre una caja de Petri que contenía solución fisiológica fría. Luego se removió el tejido graso y conectivo adherente y se homogeneizó en un homogeneizador eléctrico con recipiente de vidrio-teflón. El homogenato se preparó en una relación 600 mg de tejido/ml de buffer (la composición del buffer está detallada

en la sección 2.2.5). Luego se realizaron dos lavados con un volumen igual a la mitad del volumen utilizado para homogeneizar, llegando a una relación final de 300 mg de tejido/ml de buffer.

En el caso particular de las glándulas adrenales, se determinaron los parámetros: niveles de ALDO, B, P₅ y colesterol (libre y total) y actividades de las enzimas citocromos P-450_{SCC} y P-450_{11β} y de Na⁺/K⁺-ATPasa.

Las glándulas adrenales correspondientes a cada animal se manipularon juntas. El homogenato de las mismas se realizó siguiendo un procedimiento similar al utilizado para homogeneizar otros tejidos.

En aquellos experimentos donde se trabajó con la zona glomerulosa y la zona fasciculata por separado, las glándulas adrenales se decapsularon, definiendo a la fracción capsular como rica en zona glomerulosa y a la fracción central (core) como zona fasciculata-reticularis.

2.2.7 Incubaciones con la Fracción Mitocondrial

Los homogenatos de las glándulas adrenales provenientes de los animales infundidos se sometieron a un fraccionamiento subcelular, siguiendo el protocolo de centrifugación diferencial utilizado por Cozza *et al.* [4]; en la figura 2.2 se esquematiza el procedimiento realizado.

Los homogenatos se centrifugaron a 900 g durante 10 minutos, obteniéndose el pellet A (fracción nuclear) y el sobrenadante A; la fracción nuclear se lavó con buffer. Luego, el sobrenadante A se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos, obteniéndose el pellet B (fracción mitocondrial) y el sobrenadante B (sobrenadante post-mitocondrial); la fracción mitocondrial se lavó con buffer.

Para verificar la validez del fraccionamiento se ensayó en las distintas fracciones subcelulares la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) como índice de distribución de la fracción mitocondrial (ver sección 2.9).

Las distintas fracciones subcelulares se conservaron para la determinación de los niveles de colesterol en cada una de ellas. Por otro lado, se ensayó la actividad de las enzimas citocromo P-450_{SCC} y citocromo P-450_{11β} *in vitro*, utilizando mitocondrias como fuente enzimática.

La determinación de la actividad de citocromo P-450_{SCC} se llevó a cabo según el método descrito por Kramer *et al.* [219]. Brevemente, se determinó la actividad enzimática

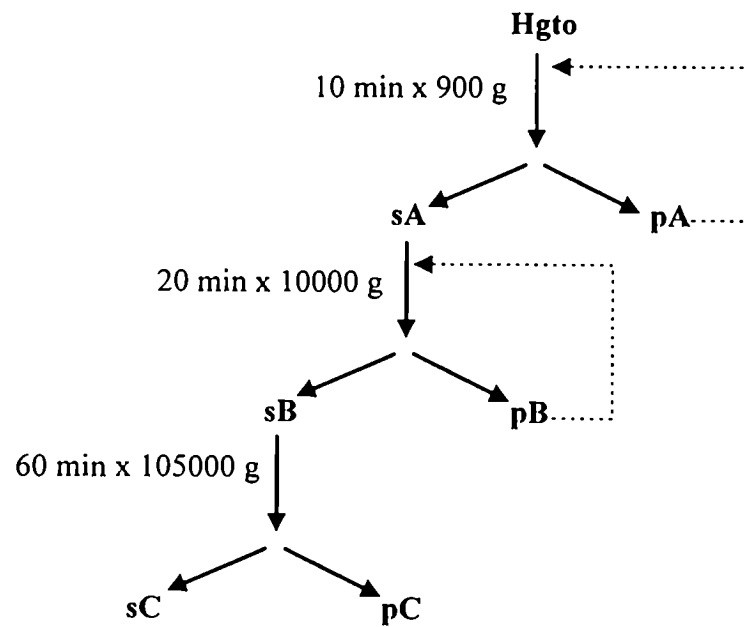


Figura 2.2: Esquema del procedimiento seguido para la obtención de fracciones subcelulares Hgto: homogenato inicial, pA: pellet enriquecido en núcleos, sA: sobrenadante A, pB: pellet enriquecido en la fracción mitocondrial, sB: sobrenadante post-mitocondrial, pC: fracción microsomal y sC: fracción soluble.

como la cantidad de P_5 producida a partir del colesterol endógeno presente en mitocondrias aisladas (0.8 mg de proteína, determinadas por Bradford [220]), incubadas en un buffer adecuado (ver sección 2.2.5) en presencia de $NADP^+$ 0.5 mM y malato de sodio 7 mM. La incubación se realizó a 37°C durante 5 minutos y la misma se interrumpió por agregado de 10 ml de CH_2Cl_2 . El extracto orgánico se guardó a -20°C para determinar P_5 por radioinmunoensayo.

La determinación de la actividad enzimática del citocromo $P-450_{11\beta}$ se realizó de la siguiente manera: la fracción mitocondrial correspondiente a una adrenal, aproximadamente 0.8 mg de proteína (determinadas según Bradford [220]), se incubó por duplicado durante 15 minutos en un baño termostatzado a 37°C, en tubos de Kahn de vidrio borosilicato. La incubación se realizó en un buffer adecuado, descrito en la sección 2.2.5, conteniendo $NADP^+$ 0.5 mM y malato de sodio 7 mM en presencia o ausencia del sustrato DOC 30 μ M, llegando a un volumen final de 0.65 ml en cada incubado.

Para realizar la incubación, primeramente se pipeteó en cada tubo la solución del sustrato DOC, que se encontraba disuelto en una solución de tolueno:etanol (9:1); una vez pipeteada la solución del sustrato, se llevó a residuo seco bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. Luego, a cada tubo, se le agregó 0.2 ml de buffer y los mismos se incubaron durante 30 minutos a 37°C para permitir, así, la disolución del esteroide que se encontraba como residuo seco. Los tubos conteniendo el esteroide disuelto se transfirieron a un baño a 0°C donde se les agregó la fracción mitocondrial. Pasados 10 minutos se inició la reacción, por agregado de la mezcla de $NADP^+$ + malato de sodio, transfiriéndose los tubos a un baño termostatzado a 37°C.

La curvas correspondientes a la producción de ALDO *vs* tiempo de reacción mostraron linealidad hasta los 20 minutos; se decidió, entonces, realizar las incubaciones durante 15 minutos.

Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -20°C para la determinación de los niveles de ALDO producidos.

2.2.8 Obtención de Microsomas

La preparación de la fracción microsomal se llevó a cabo con el objeto de poder determinar la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa. Los microsomas se obtuvieron partiendo de homogenatos de cápsula o core de glándula adrenal, a través de centrifugación diferencial.

En principio, el protocolo seguido es similar al llevado a cabo para la obtención de fracción mitocondrial (ver figura 2.2). Luego, el sobrenadante B (fracción postmitocondrial) se centrifugó a 105000 g durante 60 minutos. El pellet obtenido, que contenía la fracción enriquecida en microsomas, se utilizó para la determinación de la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ .

2.2.9 Extracción de Esteroides Plasmáticos

En general, la cuantificación de esteroides no requirió de una purificación previa de los mismos a partir de las diferentes preparaciones biológicas. En el caso particular de la determinación del nivel de esteroides plasmáticos fue necesario, sin embargo, realizar una extracción orgánica previa a la cuantificación.

Para ello, se colectaron 4 ml de sangre arterial en tubos heparinizados. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 1500 g y se extrajo 1 ml de plasma con 5 ml de CH_2Cl_2 dos veces consecutivas. El extracto orgánico se llevó a sequedad bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente y el residuo seco obtenido se disolvió en 200 μl de buffer borato de sodio 0.1 M, de pH = 8, conteniendo 5% de etanol. Dicha solución se guardó a -20°C hasta su utilización para la cuantificación de los esteroides.

2.3 Estudios *in vitro*

Los ensayos *in vitro* con células aisladas se realizaron principalmente con el objeto de poder dilucidar los posibles mecanismos involucrados en las acciones de los agentes estudiados, para corroborar los efectos encontrados en los experimentos *in vivo* y para determinar si estos últimos eran directos o a través de otros órganos y/o sistemas. Por otro lado, el hecho de trabajar con un sistema más simple que el animal entero, como las células dispersas, disminuye el número de variables a considerar y permite interpretar los resultados en forma más clara. De todas maneras, siempre que fuese posible, estos estudios se completaron con los ya descritos *in vivo* con el fin de garantizar la relevancia fisiológica que los resultados *in vitro* pudiesen tener.

Los ensayos se realizaron incubando las células dispersas con los diferentes agentes estimuladores de la respuesta adrenal, en presencia o ausencia de distintos bloqueantes de las vías de transducción de señales.

Las respuestas celulares medidas fueron: los niveles de ALDO y B; el aumento de

distintos segundos mensajeros (DAG, cAMP, Ca^{++}); la incorporación de colesterol a las células y la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa.

Además, se determinó la unión de distintos ligandos radioactivos a receptores específicos.

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la preparación de la suspensión celular utilizada en estos experimentos.

2.3.1 Soluciones Buffers Utilizadas

En los primeros ensayos se utilizó la solución buffer Krebs-Ringer Bicarbonato, cuya composición es la siguiente: NaHCO_3 13.5 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.2 mM, CaCl_2 2.6 mM, MgSO_4 1.3 mM, glucosa 11 mM y seroalbúmina bovina libre de lípidos 0.2% p/v, de pH = 7.4.

Más tarde, se optó por utilizar medio Ham F12 (Sigma N6760) suplementado con CaCl_2 hasta una concentración final 1.8 mM, debido a que el rendimiento de células viables fue considerablemente mayor al obtenido con el buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato.

2.3.2 Drogas Ensayadas: Sus concentraciones

A continuación se detalla una lista de las drogas ensayadas en los estudios *in vitro*. Las concentraciones de las mismas se eligieron de acuerdo a datos proporcionados por la bibliografía y mediante el trazado de curvas dosis-respuesta, a partir de experimentos realizados para tal fin. Algunas de las soluciones stock preparadas ya fueron descritas en la sección 2.2.2

ACTH: De acuerdo a los valores obtenidos de bibliografía [221,222], la respuesta máxima adrenal mediada por ACTH se observa al incubar las células con una concentración 10^{-9} M del péptido. En los experimentos realizados, se verificó este dato mediante el trazado de curvas dosis-respuesta.

ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄: Los péptidos ensayados fueron de Sigma Chemicals, preparados en una solución stock 50 μM en CH_3COOH 0.15% v/v. La concentración utilizada fue obtenida de bibliografía [155] y comprobada experimentalmente, siendo la misma 100 nM.

A II: Se trazaron curvas dosis-respuesta utilizando concentraciones en un rango que varió entre 10^{-10} M y 10^{-8} M; estas concentraciones producen un aumento submáximo y máximo respectivamente, en la biosíntesis de ALDO de acuerdo con lo descrito por Haning *et al.* [223].

BQ-123: Se utilizó una concentración 100 nM; dicha concentración se eligió de acuerdo al valor de $K_i = 4 \cdot 10^{-9}$ M descrito por otros investigadores [201,202] y por el trazado de curvas de desplazamiento.

DAG: Se utilizó 1,2-dioctanoil-sn-glicerol (C8:0) de Sigma Chemicals, preparado en una solución 10 mg/ml en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato conteniendo 2.4% de DMSO. Las concentraciones ensayadas fueron: 25 μ g/ml, 100 μ g/ml y 500 μ g/ml, de acuerdo con lo descrito por Lobo y Marusic [224].

Dibutiril-adenosin-monofosfato cíclico (diBu-cAMP): Se utilizó el nucleótido cíclico de Sigma Chemicals, preparado en una solución 200 mM en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato. Las incubaciones se realizaron en presencia de diBu-cAMP 10^{-3} M. Dicha concentración corresponde a una estimulación máxima de la biosíntesis de ALDO, de acuerdo con lo descrito por otros investigadores [225,226,227].

Endotelina (ET-1): Se trazaron curvas dosis-respuesta que abarcaron un rango de concentraciones entre 10^{-11} M y 10^{-8} M. La respuesta máxima adrenal correspondió a la concentración 10^{-9} M; esta dosis se utilizó en los experimentos sucesivos.

Ester de forbol: Se utilizó 1,3-miristato-13-acetato de forbol (PMA) de Sigma Chemicals, preparado en una solución 2 mM en DMSO. Las condiciones de incubación con esta sustancia se eligieron de manera de obtener distintos grados de activación o depleción de la proteína quinasa C [228,229,230]. Para ello, la preparación celular se incubó con concentraciones de PMA que abarcaron un rango entre 1 nM y 4 μ M.

Forskolina (FK): Se utilizó la droga de Sigma Chemicals preparada en una solución stock 100 mM en solución fisiológica. La preparación celular se incubó con FK 4 μ M y 10 μ M. Estas concentraciones corresponden a estimulaciones submáxima y máxima de la enzima adenilciclase, respectivamente [231].

Fosfolipasa C (PLC): Se ensayaron dos enzimas diferentes, una obtenida a partir de *Clostridium perfringens* y otra de *Bacillus cereus*; ambas proteínas son de Sigma Chemicals (No. Cat.: P 7633 y P 4039 para *C. perfringens* y P 6135 para *B. cereus*). PLC se almacenó en una solución 50 U.I./ml en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato. Se trazaron curvas dosis-respuesta empleando concentraciones de PLC en un rango que varió entre 1 y 10 U.I./ml.

H₇: Las incubaciones se realizaron en presencia de H₇ 100 μM. Esta concentración corresponde a una inhibición máxima de la actividad de la enzima proteína quinasa C de acuerdo a datos obtenidos de bibliografía [217].

Ouabaína: Se utilizó la droga de Sigma Chemicals empleando concentraciones en un rango que varió entre 10⁻⁷ M y 10⁻³ M. Estas concentraciones se eligieron de acuerdo con lo descrito por otros investigadores [47,114,115,232,105,233,234] y comprobando experimentalmente que la concentración de ouabaína 10⁻³ M produce inhibición máxima de la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa (ver capítulo 4).

R₅₉₀₂₂: Este compuesto fue descrito por Courcelles *et al.* como inhibidor de la enzima diacilglicerol-quinasa [235]. Se utilizó la droga de Janssen Life (Bélgica) preparada en una solución 10 mM en etanol absoluto. Las concentraciones usadas abarcaron un rango entre 1 nM y 250 μM, de acuerdo con datos obtenidos de bibliografía [235,236,237] y comprobado experimentalmente.

Sarafotoxina (S_{6b}): Dada la homología estructural y funcional con ET-1 [196,178], se ensayaron las mismas concentraciones a fin de comparar los efectos producidos por ambos péptidos.

Staurosporina (St): Se utilizó la droga de Sigma Chemicals preparada en una solución 160 μM en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato conteniendo 3.9% de DMSO. De acuerdo a los valores de K_i informados por otros investigadores [238], se trazaron curvas de inhibición en función de concentraciones de St en un rango que varió entre 160 pM y 16 μM.

Toxina de cólera (CT): Se utilizó la droga de Sigma Chemicals, preparada en una solución 1 mg/ml en medio Ham F12. Las células se incubaron con CT 1 μg/ml; esta

concentración produce 90% de estimulación de la formación de cAMP [239].

2.3.3 Preparación de Células Dispersas

Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron las glándulas adrenales, a las que se les quitó el tejido graso adherido. Este procedimiento se realizó sobre una caja de Petri conteniendo solución fisiológica fría. Las glándulas se decapsularon, obteniéndose la fracción capsular (enriquecida en zona glomerulosa) y la fracción central (enriquecida en zona fasciculata-reticularis). Cada fracción se manipuló por separado.

El tejido se colocó en 10 ml de medio de incubación (ver composición en la sección 2.3.1), conteniendo 0.18% de colagenasa y 2% de seroalbúmina bovina. Esta preparación se incubó en un baño termostatzado a 37°C, con agitación durante 20 minutos. A los 10 y 20 minutos de iniciada la incubación, se disgregó el tejido en forma mecánica. Finalizada la incubación, se filtró la preparación celular a través de una malla de nylon. Los restos de tejido no disgregado, que quedaron retenidos en la malla, se descartaron.

El filtrado se centrifugó a 900 g durante 10 minutos. El pellet celular se lavó con 10 ml de medio libre de colagenasa, se resuspendió suavemente utilizando una pipeta de transferencia y se llevó a un volumen adecuado con medio de incubación. Una alícuota de la preparación celular se cuantificó en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico con un aumento de 400x. La viabilidad de la células se determinó mediante la técnica de exclusión del colorante Azul Tripán (0.1 ml de solución Azul Tripán en 1 ml de suspensión celular)³ Se consideraron células viables aquellas que no presentaban tinción alguna en interior de sus núcleos.

La suspensión celular se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación, a fin de restablecer a las células del stress producido durante el tratamiento con colagenasa. Luego, la preparación se centrifugó a 900 g durante 10 minutos; el pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen adecuado para ser utilizado en los diferentes estudios.

2.3.4 Incubaciones con Células Dispersas

En la mayoría de los experimentos realizados se siguió un procedimiento básico para llevar a cabo las incubaciones con células dispersas; el mismo se detalla a continuación.

³La solución de colorante Azul Tripán tenía la siguiente composición: Azul Tripán 0.4% p/v, NaCl 0.8% p/v y K₂HPO₄ 0.06% p/v.

La preparación celular se incubó a razón de 10^5 células por tubo durante 90 minutos en un baño termostatzado a 37°C con agitación. Cada tratamiento se efectuó por duplicado en tubos de Kahn de polipropileno. Tanto las células como los agentes estimulantes se agregaron a tiempo cero, llevando la preparación a un volumen final de 0.5 ml con medio de incubación (ver composición en la sección 2.3.1).

Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos (con esta velocidad de centrifugación se asegura la ruptura de las células y la liberación al medio, de los diferentes metabolitos). Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -20°C hasta su utilización para la determinación de los productos formados⁴.

El protocolo arriba descrito se modificó en determinados ensayos, según fuera el objetivo a llevar a cabo. A continuación se detallan las variantes realizadas a este procedimiento básico, según el tipo de ensayo específico que se realizara.

Incubaciones en presencia de bloqueantes de las vías de transducción de señales: A fin de estudiar la participación de una u otra vía de transducción de la señal, en la respuesta adrenal a los distintos estimuladores, se llevaron a cabo ensayos en presencia o ausencia de diferentes bloqueantes o inhibidores de dicha transmisión.

En estos experimentos, el protocolo seguido fue ligeramente diferente al descrito como procedimiento básico. Las células se preincubaron durante 15 minutos a 37°C , en presencia de distintas concentraciones de inhibidores. Pasados los 15 minutos se agregaron, según correspondiese, los agentes estimuladores de la respuesta adrenal. Luego el protocolo siguió de la misma forma a la descrita como procedimiento básico.

Incubaciones realizadas con ésteres de forbol: El objetivo de estas incubaciones fue depletar a las células de PKC para estudiar la posible participación de esta enzima en la esteroidogénesis mediada por ACTH. Para ello se preincubó la preparación celular con distintas concentraciones de PMA, durante 2 horas a 37°C , con agitación [228,75,229,230,240,98]. Finalizada la preincubación, la preparación celular se centrifugó a 900 g durante 10 minutos. El pellet celular se lavó con 5 ml de buffer a fin de eliminar por completo el PMA no incorporado. Las células se incubaron con ACTH, durante 1 hora a 37°C ,

⁴En aquellos ensayos donde se determinaron los niveles de cAMP presentes, se procedió de manera diferente: a partir de los sobrenadantes obtenidos en la centrifugación, se tomaron alícuotas de 300 μl ; estas soluciones se incubaron durante 3 minutos a 100°C a fin de inactivar las fosfodiesterasas que pudieran estar presentes, y luego se congelaron.

siguiéndose luego el procedimiento básico arriba descrito.

Estudios de unión de [125 I]-ET-1 y [125 I]-S₆b: El objetivo de estos ensayos fue estudiar la presencia de receptores a ET en la zona glomerulosa adrenal de rata. Para ello, se realizaron experimentos de competencia. Se incubaron en tubos de Kahn de polipropileno, 10⁵ células con [125 I]-ET-1 o [125 I]-S₆b (50000 dpm, Ae = 800 Ci/mmol y 600 Ci/mmol para [125 I]-ET-1 y [125 I]-S₆b, respectivamente), en presencia de concentraciones crecientes de ET-1, S₆b o BQ-123 radioinertes, durante 90 minutos a 37°C, con agitación. Finalizada la incubación, la preparación celular se centrifugó a 900 g durante 10 minutos a 10°C. El pellet obtenido se lavó dos veces con un volumen de medio frío, a fin de eliminar el péptido iodinado no unido a los receptores. La radioactividad asociada a las células se cuantificó en un contador de centelleo sólido LKB Modelo 1272 Clinicgamma. A partir de los resultados obtenidos se trazaron curvas de desplazamiento (porcentaje de radioactividad asociada al pellet celular *vs.* logaritmo de la concentración del péptido desplazante).

Radioiodinación de ET-1 y S₆b⁵: El método de radioiodinación fue descrito por Cozza *et al.* [191]. Brevemente, a 20 μ l de buffer fosfato de sodio 0.5 M, de pH= 7 conteniendo el péptido, se le agregó 10 μ l de 125 INa (1 mCi) y 10 μ l de cloramina T (0.5 mg/ml en buffer fosfato de sodio). La reacción transcurrió durante 30 segundos interrumpiéndose por agregado de 10 μ l de cisteína (2.3 mg/ml en buffer fosfato). La mezcla de reacción se diluyó a 100 μ l con agua y luego, el péptido iodinado se purificó por HPLC. La actividad específica del radioligando se determinó por el método de autodesplazamiento descrito por Calvo *et al* [241].

Acción de ET-1 sobre los glicerolípidos: La estrategia se basó en incorporar, primeramente, [3 H]-Glicerol a las células, a fin de permitir el marcado radioactivo de los diferentes glicerolípidos hasta alcanzar un estado estacionario (ver capítulo 4). Luego se estudió el efecto de ET-1 sobre la hidrólisis de dichos glicerolípidos.

Con este fin, la preparación celular se preincubó durante dos horas a 37°C con agitación en presencia de aproximadamente 5 μ Ci de [3 H]-Glicerol. Finalizada la preincubación,

⁵Ambos péptidos iodinados fueron cedidos por el Dr. C. E. Gómez-Sánchez, Department of Internal Medicine, College of Medicine, University of South Florida and J.Haley Veterans Hospital, Tampa, FL. USA

los tubos se centrifugaron a 900 g durante 10 minutos. El pellet celular se lavó dos veces, con un volumen de medio a fin de asegurar la completa eliminación del [2-³H]-Glicerol no incorporado a las células. Luego, la preparación celular se incubó a 37°C durante diferentes tiempos (0; 1; 2; 5 y 10 minutos) en presencia o ausencia ET-1, S₆b o BQ₁₂₃. Las incubaciones se realizaron en tubos de ensayo, de vidrio de borosilicato, con un volumen final de 0.5 ml. La reacción se detuvo por agregado de 2 ml de CH₃OH. Luego de agitar cada tubo vigorosamente, los lípidos presentes se extrajeron con 5 ml de CH₂Cl₂ dos veces sucesivas. La fase orgánica se lavó, dos veces, con 0.5 ml de H₂O destilada.

Seguidamente, los extractos orgánicos, conteniendo los lípidos a analizar, se incubaron a 37°C durante 10 minutos (así, el agua contenida en la fase orgánica quedó adherida a las paredes del tubo y se eliminó al transferir el extracto a un tubo limpio). Finalmente, los extractos orgánicos se guardaron a 4°C hasta su utilización para la cuantificación de los niveles de glicerolípidos radioactivos por cromatografía en capa delgada (TLC) (ver sección 2.6).

Incorporación de ⁴⁵Ca⁺⁺: Los ensayos de incorporación de ⁴⁵Ca⁺⁺ se realizaron a fin de estudiar el efecto de ET-1 sobre el influjo de Ca⁺⁺. Una vez obtenidas las células se incubaron en presencia del agente estimulante a 37°C con agitación. A los 30 segundos se agregó ⁴⁵CaCl₂ (0.5 μCi, Ae = 16 Ci/mmol) y la incubación se dejó transcurrir durante 1 minuto [242]. La incubación se interrumpió por filtración de la preparación celular a través de un filtro de fibra de vidrio de 0.45 μm de tamaño de poro, conectado a una trampa de agua. Las células, que quedaron retenidas en el filtro, se lavaron con 6 volúmenes de medio Ham F12 conteniendo CaCl₂ 1.8 mM. Los filtros se secaron y se contó la radioactividad asociada a los mismos en un contador de centelleo líquido, Wallac, modelo 1214 Rackbeta.

En aquellos ensayos donde se analizó la acción de posibles bloqueantes de la acción de ET-1, los mismos se agregaron a la preparación celular 20 segundos antes que ET-1.

Los resultados se expresaron como dpm de ⁴⁵Ca⁺⁺ incorporadas/10⁵ cél.

Distribución subcelular de [³H]-Colesterol: Los ensayos de distribución subcelular se realizaron a fin de completar los estudios de incorporación y distribución de colesterol mediado por ET-1, llevados a cabo en experimentos *in vivo* y *ex vivo* (ver sección 2.7). La suspensión celular se preincubó con suero enriquecido en [1,2-³H(N)]-Colesterol (aproximadamente 0.5 μCi) durante 2 horas a 37°C en presencia de AMG 1 mg/ml. Finalizada la preincubación, las células se lavaron a fin de eliminar el colesterol no incorporado a

las mismas. Luego, la suspensión celular se incubó con ET-1 10^{-9} M durante 1 hora a 37°C . Finalizada la incubación, la preparación celular se homogeneizó y los homogenatos se centrifugaron de acuerdo con la metodología descrita en la sección 2.2.7. La radiactividad asociada a las distintas fracciones se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como porcentaje de la radiactividad correspondiente a cada fracción con respecto a la radiactividad asociada al homogenato total.

2.4 Cuantificación de Esteroides

La técnica utilizada para cuantificar los esteroides ALDO, B y P_5 fue el radioinmunoensayo (RIA) ⁶. En el caso particular del RIA de ALDO, la técnica se puso a punto en el laboratorio utilizando anticuerpos monoclonales específicos [243]. El radioinmunoensayo se validó comparando los datos obtenidos a partir del mismo, con los valores obtenidos por otro método de cuantificación, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En esta sección se detallan los pasos que se siguieron para cuantificar los esteroides por RIA, para determinar los porcentajes de variación intra e interensayo, para verificar la validez de la técnica (mediante un ensayo comparativo con HPLC) y para corroborar la especificidad de los anticuerpos monoclonales mediante ensayos de reacción cruzada entre dichos anticuerpos y otros esteroides presentes en las muestras biológicas.

2.4.1 Protocolo general del RIA de esteroides

La reacción se llevó a cabo por duplicado, en tubos de Kahn de polipropileno; en un volumen final de 0.2 ml de buffer borato de sodio 0.1 M, de $\text{pH} = 8$, conteniendo 1% de la fracción V de seroalbúmina bovina y 0.2% de inmunoglobulina G.

La cuantificación se realizó a través de una curva de calibración, construída con concentraciones crecientes de standards del esteroide a cuantificar, preparada en buffer borato de sodio 0.1 M, de $\text{pH} = 8$, conteniendo 5% de etanol.

La preparación de los standards para construir la curva de calibración se realizó mediante diferentes diluciones, a partir de una solución madre.

El protocolo general consistió en pipetear, primeramente, $10 \mu\text{l}$ de los standards o de

⁶Los anticuerpos fueron cedidos por el Dr. C.E. Gómez-Sánchez, Department of Internal Medicine, College of Medicine, University of South Florida and James A. Haley Veterans Hospital, Tampa, Fl. USA.

las muestras incógnitas, luego se agregó el esteroide marcador (^3H)-Esteroide aproximadamente 5000 dpm) y el anticuerpo específico del esteroide a cuantificar, disueltos en el buffer arriba descrito. Para determinar el aporte de interacciones no específicas se incubó por duplicado, el marcador ^3H -Esteroide en ausencia de anticuerpo. El valor de unión no específica obtenido de esta manera fue estadísticamente indistinguible del obtenido por adición de un exceso (100x) de esteroide standard radioinerte ($n = 10$, $p < 0.25$). Esto sería indicativo de que la principal fuente de unión no específica es la pared del tubo y/o las proteínas del buffer.

La reacción transcurrió durante 16 horas a 4°C . Pasado ese tiempo, la incubación se interrumpió por el agregado de 0.4 ml de una solución fría de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75% de saturación. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 2500 g durante 20 minutos, en centrífuga refrigerada (4°C). Los sobrenadantes obtenidos, que contenían el esteroide no unido al anticuerpo, se volcaron a viales para conteo de la radiactividad presente en cada muestra. Luego, los viales se llevaron a 3.5 ml con solución de tolueno centelleante (ver composición en la sección 2.10) y se agitaron vigorosamente para facilitar la distribución del esteroide tritiado a la fase orgánica. Finalmente, se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido, Wallac, modelo 1214 Rackbeta.

En los casos en que se estudió la reacción cruzada de un anticuerpo con otro esteroide distinto a aquel utilizado como antígeno para su desarrollo, la solución standard de éste fue reemplazada por una solución de aquel.

RIA de ALDO: La curva de calibración abarcó un rango entre 2.5 y 150 pg. El marcador $[1,2\text{-}^3\text{H}(\text{N})]$ -ALDO tenía una $A_e = 40\text{-}60 \mu\text{Ci/nmol}$. Se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de un hibridoma de ratón, siendo el título utilizado de 1/2000 (ver sección 2.4.3).

RIA de B: La curva de calibración abarcó un rango entre 20 pg y 10 ng; el marcador $[1,2\text{-}^3\text{H}(\text{N})]$ -B tenía una $A_e = 40\text{-}60 \mu\text{Ci/nmol}$. Se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado en oveja, cuyo título fue 1/600 (ver sección 2.4.3).

RIA de P_5 : En este caso, la curva de calibración abarcó un rango entre 20 pg y 10 ng; el marcador $[1,2\text{-}^3\text{H}(\text{N})]$ - P_5 tenía una $A_e = 50 \mu\text{Ci/nmol}$ y se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, cuyo título fue 1/500.

Cálculo de la masa de esteroide cuantificada: De los datos obtenidos a partir de la medición de la radioactividad (esteroide libre, cpm) se obtuvieron los valores de esteroide unido (cpm) (variable y), los cuales fueron transformados a valores de masa de esteroide (variable x) mediante un programa de computación [244] que ajusta los valores obtenidos a partir de la curva de calibración, a la función de 4 parámetros descrita más abajo (ec. 2.1) calculando por iteración los coeficientes A , B , C y D ,

$$y = \frac{A - D}{1 + \frac{x}{C}^B} + D, \quad (2.1)$$

donde se define a A como la máxima cantidad unida; B la pendiente de la curva en el punto de inflexión; C la concentración efectiva 50 y D la unión inespecífica. Una vez calculados dichos parámetros, se determinaron las masas de esteroide contenidas en las muestras analizadas, despejando la variable x de la función 2.1.

Los niveles de esteroides determinados se expresaron como masa/mg de prot. o masa/adrenal en los experimentos *in vivo*, y como masa de esteroide/ 10^5 cél en los experimentos *in vitro*. Las proteínas se determinaron por el método de Bradford [220].

2.4.2 Purificación del Marcador Radioactivo

El esteroide radioactivo se purificó por HPLC antes de su uso. Para ello se utilizó 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, lámpara de Hg) para monitorear el efluente a 254 nm, y un registrador Omni Scribe modelo B-5117-1 de una sola pluma.

Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron las siguientes:

- **fase fija:** Se utilizó una columna de acero inoxidable de 250 mm de largo x 3.9 mm de diámetro interno que contenía, como relleno, partículas de sílica unidas a octadecasilano (μ -Bondapak- C_{18}).
- **fase móvil:** Se utilizó la mezcla de solventes $CH_3OH : H_2O$ (3 : 2), previamente degaseada.
- **flujo:** La corrida se realizó a un flujo de 0.8 ml/min.

- **procedimiento:** Antes de realizar las determinaciones, la columna se limpió con 50 ml de CH₃OH, 100 ml de Cl₃CH y 50 ml de CH₃OII sucesivamente, a un flujo de 2.5 ml/min.

Las muestras se disolvieron en 30 μ l de CH₃OH y se inyectaron en el cromatógrafo. Los tiempos de retención (T_R) para ALDO y B fueron 7 min. y 16 min, respectivamente. El material correspondiente al pico de elución del esteroide cromatografiado, se colectó siguiendo el procedimiento descrito por Cozza *et al.* [245] (ver figura 2.3). Brevemente, desde dos minutos antes de la aparición del pico de elución se colectaron fracciones cada 15 segundos, y dicha recolección se mantuvo hasta dos minutos después de alcanzada la altura máxima del mismo. Posteriormente, alícuotas de dichas fracciones, se contaron en un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214 Rackbeta). Se consideraron fracciones útiles, aquellas que se encontraban contenidas dentro de la porción correspondiente a $3/5 h_{max}$ del pico de elución, (ver figura 2.3).

El esteroide purificado se almacenó en una solución tolueno : etanol (9 : 1) a -20°C hasta su utilización.

2.4.3 Determinación del Título del Anticuerpo

Se prepararon distintas diluciones del anticuerpo anti-esteroide⁷, en buffer borato de sodio 0.1 M, de pH=8, conteniendo 5% de etanol. Las soluciones abarcaron un rango entre 1/100 y 1/10000. Luego se agregó el marcador radioactivo (5000 dpm), disuelto en el buffer descrito en la sección 2.4.1.

El procedimiento continuó de manera similar a la descrita en la sección 2.4.1 para determinar el esteroide unido al anticuerpo. Seguidamente, se trazaron curvas de esteroide unido específicamente al anticuerpo en función de la dilución de anticuerpo utilizada. Las curvas obtenidas se observan en la figura 2.4. De acuerdo a las mismas, se decidió trabajar con un título tal que forme una cantidad de complejo esteroide-anticuerpo equivalente al 40-60% del esteroide total inicialmente agregado (aprox. 5000 dpm). Las diluciones utilizadas para los anticuerpos de ALDO y B fueron 1/2000 y 1/600, respectivamente.

⁷El anticuerpo de P₅ se recibió listo para ser utilizado inmediatamente, siendo el título del mismo 1/500.

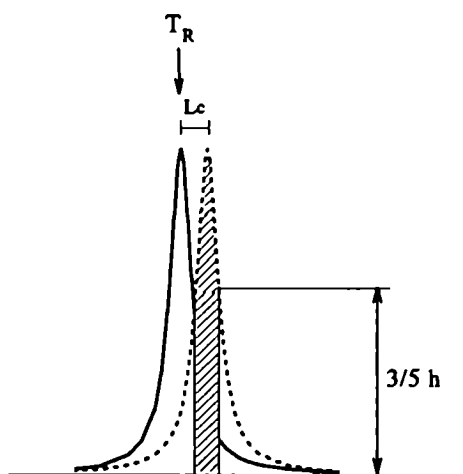


Figura 2.3: Esquema de recolección del esteroide purificado por HPLC

Esta figura esquematiza un pico de elución detectado a 254 nm (—) y un pico construido a partir de los datos obtenidos al contar las alícuotas de las distintas fracciones en un contador de centelleo líquido (...). T_R : tiempo de retención h : altura máxima del pico de elución graficado de acuerdo a la radioactividad colectada. El área sombreada corresponde a las fracciones recuperadas para ser utilizadas como marcador. L_c : lag de colección según Cozza *et al.* [245].

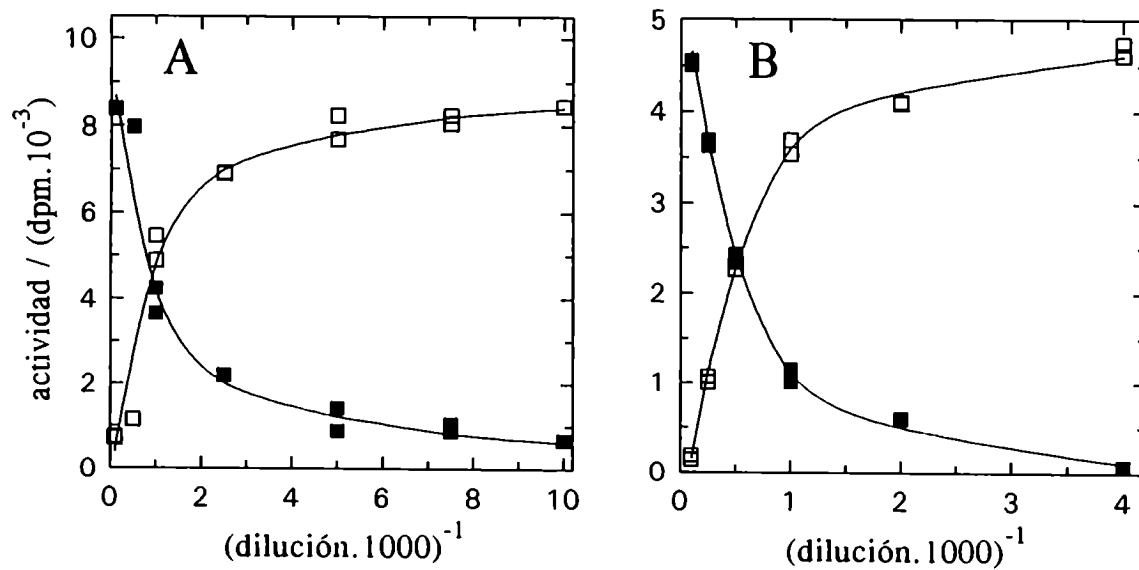


Figura 2.4: Curvas realizadas para calcular el título de anticuerpo anti-esteroide
Panel A: curva de dilución del anticuerpo anti-ALDO, panel B: curva de dilución del anticuerpo anti-B. □: dpm libres, ■: dpm unidas.

2.4.4 Verificación por HPLC de la Información Obtenida por RIA

A fin de comprobar la validez de la información obtenida de la cuantificación de esteroides por medio del RIA, el contenido de esteroides de una muestra biológica se cuantificó, además, utilizando la técnica de HPLC. La muestra provino de un homogenato de cápsula adrenal, la cual se extrajo con cinco volúmenes de eter etílico, dos veces sucesivas. El extracto orgánico se llevó a sequedad y se resuspendió en 100 μ l de metanol. Una alícuota de 25 μ l se inyectó en un cromatógrafo Waters Associates (Milford Mass, U.S.A.). La muestra se corrió bajo las condiciones descritas en la sección 2.4.2.

Con el fin de evaluar la recuperación de la metodología empleada, una nueva muestra de homogenato fue tratada de la misma manera, pero luego de agregarle una cantidad conocida de ALDO tritiada (aproximadamente 10000 dpm).

El cálculo de la masa de esteroide se realizó interpolando el valor del área del pico de elución obtenido, con una curva de calibración área *vs.* masa, previamente confeccionada con standards de masa conocida del esteroide a cuantificar.

Por otro lado, otra alícuota se cuantificó por RIA de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 2.4.1.

2.5 Determinación de los Niveles de cAMP

La determinación de los niveles de cAMP se realizó a fin de estudiar, en los ensayos *in vitro*, la regulación de la producción de este segundo mensajero, que forma parte de una de las principales vías de transducción de señales que conduce a un aumento de la esteroidogénesis adrenal.

La cuantificación de este producto se realizó utilizando la técnica de RIA de Steiner *et al.* [246] con la inclusión de la etapa de acetilación descrita por Harper y Brooker [247]. A continuación se detalla el procedimiento seguido para llevar a cabo dicha cuantificación.

2.5.1 Protocolo General del RIA de cAMP

La reacción se llevó a cabo, por duplicado, en tubos de Kahn de vidrio de borosilicato, en un volumen final de 0.3 ml de una solución $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ 50 mM, de pII = 6.5.

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración, construída con concen-

traciones crecientes de standards de cAMP que abarcaron un rango de 0.25 a 25 pmoles. La preparación de las distintas soluciones standards se realizó mediante diferentes diluciones hechas a partir de una solución madre.

El protocolo seguido consistió en pipetear, primeramente, 100 μl de los distintos standards o las diferentes muestras. Luego, dicha preparación se acetiló mediante el agregado de 5 μl de una mezcla anhídrido acético : trietilamina (1 : 2). A continuación se agregó, a las distintas soluciones, 100 μl del marcador [^{125}I]-cAMP (10000 dpm), y 100 μl del anticuerpo específico anti-cAMP, ambos preparados en la solución $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ antes mencionada. Para determinar el aporte de interacciones no específicas, se incubó por duplicado, el marcador [^{125}I]-cAMP en ausencia de anticuerpo de acuerdo con lo descrito en 2.4.1.

La reacción transcurrió durante 16 hs. a 0°C . Pasado ese tiempo, la incubación se interrumpió por el agregado de 50 μl de una solución de seroalbúmina bovina 2%, más 2 ml de etanol 96%, previamente enfriado. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 2500 g durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. Los sobrenadantes de dicha centrifugación se descartaron y los pellets, que contenían el cAMP unido al anticuerpo, se contaron en un contador de centelleo sólido (LKB, modelo 1272 Clinigamma).

Cálculo de la masa de cAMP cuantificada: Los datos obtenidos a partir del conteo de la radioactividad presente, se transformaron a valores de pmoles de cAMP, mediante el uso de la ecuación 2.1, descrita en la sección 2.4.1. Los resultados se expresaron como pmoles de cAMP/ 10^5 cél.

2.5.2 Determinación del Título del Anticuerpo

Se prepararon distintas diluciones del anticuerpo anti-cAMP, en una solución $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ 50 mM, de pH=6.5. Las soluciones abarcaron un rango entre 1/20 y 1/1000. Luego, se agregó el marcador [^{125}I]-cAMP (10000 dpm) disuelto en el buffer ya mencionado. Para determinar el aporte de las interacciones inespecíficas, se incubó, por duplicado, el marcador en ausencia de anticuerpo (ver sección 2.4.1).

El procedimiento continuó de forma similar a la descrita en la sección 2.5.1.

Se trazó una curva de cAMP unido específicamente al anticuerpo en función de la dilución realizada. De acuerdo con el resultado de la misma se decidió trabajar con una dilución 1/200, que correspondió a un porcentaje de unión igual al 50% con respecto a la masa de cAMP total agregada.

2.5.3 Obtención del Marcador [¹²⁵I]-cAMP⁸

La iodación del cAMP fue realizada de acuerdo con la técnica descrita por Brooker *et al.* [248]. Brevemente, a 20 μ l de ¹²⁵INa (1 mCi) disueltos en buffer fosfato de potasio 0.5 M, de pH=7, se le agregó 20 μ l del derivado tirosilo de cAMP (aproximadamente 800 ng), se mezcló y luego se inició la reacción por agregado de 5 μ l de cloramina T (1 mg/ml). El nucleótido cíclico iodado se purificó por cromatografía en capa delgada sobre celulosa; el solvente de desarrollo fue 1-butanol : ácido acético glacial : agua (12:3:5). Finalizada la cromatografía, el nucleótido se eluyó de la placa con buffer CH₃COOH / CH₃COO⁻ 50 mM, de pH=4.75.

2.6 Cuantificación de Glicerolípidos

Para poder cuantificar los diferentes glicerolípidos se realizaron purificaciones por cromatografía en capa delgada a partir de los extractos orgánicos provenientes de preparaciones celulares que habían sido cargadas con [2-³H]-Glicerol y luego estimuladas con ET-1. Las condiciones de corrida dependieron de las características estructurales de los lípidos a analizar. En los párrafos siguientes se describen las cromatografías utilizadas.

Cuantificación de lípidos neutros: La purificación de los glicerolípidos neutros radiactivos se realizó mediante dos corridas cromatográficas sucesivas, en una placa delgada de sílica gel con soporte de aluminio, Kiesegel 60 F254 de 0.2 mm de espesor (TLC).

La placa se activó a 110°C durante 30 minutos, en una estufa conectada a una línea de vacío, a fin de eliminar el agua que pudiera estar adsorbida. Luego, alícuotas de los extractos orgánicos se sembraron junto con standards de masa conocida de los lípidos a cuantificar. Los standards utilizados fueron: 1-monopalmitoil-rac-glicerol (MAG), 1,2-diestearoil-rac-glicerol (DAG) y 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-1-glicerol (TAG), disueltos en una solución de CHCl₃ : CH₃OH (3:1).

En la primer cromatografía se utilizó la mezcla acetato de etilo : benceno : etanol : ácido acético (20:25:1:1), como solvente de desarrollo. La corrida cromatográfica se interrumpió cuando el frente de solvente alcanzó 75% del total de la placa. Seguidamente, se evaporó el solvente de la placa y se desarrolló la segunda cromatografía utilizándose, en este caso,

⁸El marcador [¹²⁵I]-cAMP fue cedido, gentilmente, por el Dr. Eduardo Charreau del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

la mezcla acetato de etilo : hexano (3:47) como fase móvil [249,164,250].

Finalizada la cromatografía, se reveló la posición de los distintos standards con vapores de I_2 y se determinaron los R_f correspondientes a cada uno de ellos, obteniéndose los valores: 0.32, 0.68 y 0.86 para MAG, DAG y TAG, respectivamente. Paralelamente, cada calle de la placa cromatográfica se radiocromatografió a fin de identificar los distintos productos de hidrólisis, comparando los R_f de los picos de radioactividad con los R_f de los standards utilizados. Se raspó cada zona de la placa que contenía radioactividad asociada y se contó en un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214 Rackbeta). Los resultados se expresaron como dpm/ 10^5 células.

Cuantificación de los fosfolípidos: En el sistema utilizado para separar los lípidos neutros, los fosfolípidos quedan adsorbidos es el origen de siembra, dada su alta polaridad. Una manera de estimar la cantidad de fosfolípidos remanente en cada incubación fue la de cuantificar la radioactividad asociada a la zona de siembra.

Independientemente de esa estimación, se cuantificó el contenido de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina + fosfatidiletanolamina (PC + PE) radioactivos, previa separación de los mismos por TLC. Para ello se llevaron a cabo dos corridas cromatográficas sucesivas. Las placas cromatográficas, con iguales características a las utilizadas para la separación de lípidos neutros, fueron activadas a 110°C durante 30 minutos en una estufa conectada a una línea de vacío. La primer cromatografía se desarrolló en $\text{Cl}_3\text{CH} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{NH}_3$ 4.3 N (90:65:20). La segunda corrida se desarrolló en n-propanol : NH_3 4.3 N (60:40), interrumpiéndose la misma cuando el frente de corrida alcanzó 50% del total de la placa.

Finalizada la cromatografía, se reveló la posición de los standards PI, PC y PE con vapores de I_2 , siendo los correspondientes R_f 0.5, 0.69 y 0.71, respectivamente. Luego se rasparon las zonas correspondientes a PI y a PC + PE y se determinó la radioactividad asociada a las mismas en un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214 Rackbeta). Los resultados se expresaron como dpm/ 10^5 cél.

2.7 Determinación del Colesterol Incorporado

El efecto de la infusión de ET-1 sobre la incorporación de colesterol a glándulas adrenales, se determinó según dos procedimientos diferentes.

Uno de ellos consistió en medir directamente el contenido de colesterol libre y total, presentes en ambas zonas de la glándula adrenal y en las diferentes fracciones subcelulares,

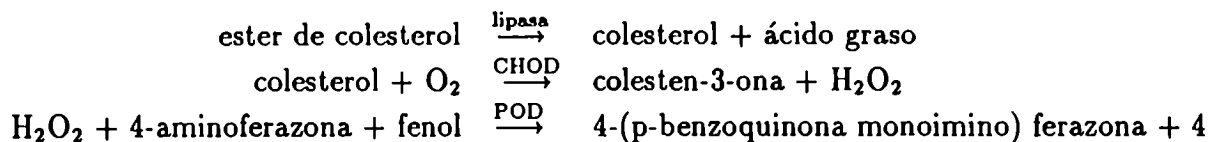


Figura 2.5: Reacción colorimétrica para medir colesterol. Lipasa: colesterol-éster hidrolasa, CHOD: colesterol oxidasa, POD: peroxidasa

utilizando para ello un método colorimétrico.

El segundo procedimiento que se realizó consistió en estudiar el efecto de ET-1 sobre la capacidad de la cápsula adrenal de incorporar colesterol radioactivo y sobre la distribución subcelular del colesterol radiactivo en células de glomerulosa. A continuación se detallan los dos procedimientos realizados.

2.7.1 Cuantificación de Colesterol por Método Colorimétrico

El contenido de colesterol se midió tanto en homogenatos como en fracciones subcelulares de adrenales provenientes de ratas infundidas con ET-1. A fin de comparar si la incorporación de colesterol mediada por ET-1 era tejida específica se determinaron, además, los niveles de colesterol en homogenatos de diferentes tejidos.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando un "kit" comercial⁹. El método se basa en el desarrollo de la reacción colorimétrica descrita en la figura 2.5; se consideró a dicha reacción cuantitativa debido a que, bajo las condiciones de trabajo, las velocidades medidas son iniciales.

Se construyeron curvas de calibración midiendo absorbancia *vs.* masa de colesterol presente. Las masas de colesterol contenidas en las muestras analizadas, se calcularon interpolando los valores de absorbancia correspondiente a cada una de ellas en la curva trazada.

El "kit" utilizado tenía la particularidad de poder cuantificar colesterol libre y total

⁹La medición de colesterol total se realizó con el kit de Wiener corp. y la determinación de colesterol libre se llevó a cabo utilizando un kit libre de colesterol-éster hidrolasa, cedido gentilmente por GT-Lab, Rosario, Argentina.

en forma independiente, dado que la enzima colesterol-ester-hidrolasa podía o no estar presente en la preparación enzimática.

El procedimiento se llevó a cabo de la forma siguiente: alícuotas de 1 ml de las muestras a analizar se extrajeron con 5 volúmenes de la mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH}$ (3:1) conteniendo 1% de MgCl_2 , dos veces sucesivas. Los extractos orgánicos se dividieron en cuatro partes iguales y se evaporaron bajo atmósfera de N_2 a 37°C . Los residuos secos se resuspendieron en 0.1 ml de H_2O destilada y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto. Luego, el contenido de colesterol libre y total se cuantificó, por duplicado, en forma independiente.

El ensayo consistió en agregarle, a cada muestra, 2.5 ml de reactivo cuya composición es la siguiente: lipasa 6000 U/l, colesterol oxidasa 60 U/l, peroxidasa 400 U/l, fenol 2.75 mM y 4-aminoferrazona 1.25 mM, de $\text{pH} = 7.4$.

Los tubos se incubaron durante 15 minutos a 37°C y luego se midió la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro de doble haz marca Shimadzu, modelo UV-3000.

Curva de calibración: La curva de calibración se construyó según dos procedimientos diferentes. El primero consistió en utilizar, como standard, distintas concentraciones de una solución acuosa de colesterol.

El segundo procedimiento consistió en tratar una masa conocida de colesterol en forma similar a las muestras. Así, el colesterol se disolvió en la mezcla de extracción, se llevó a residuo seco y luego se lo resuspendió en H_2O destilada. De esta manera, se aseguró que tanto el standard como las muestras sufrieran las mismas pérdidas durante la preparación. En la figura 2.6 se observan las curvas obtenidas por sendos procedimientos.

Los factores de conversión calculados a partir del trazado de esas curvas son ligeramente diferentes, 187 y 258 μmol colesterol/U.abs. para standard soluble y standard en residuo seco, respectivamente. De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar el segundo procedimiento, dado que, si bien el otro método es menos laborioso y más sensible (por tener un factor menor), se cometen errores por defecto en la determinación de la masa de colesterol presente en las muestras. Los resultados se expresaron como masa de colesterol/mg de prot.; las proteínas se determinaron por el método de Bradford [220].

2.7.2 Ensayo de Incorporación de [^3H]-Colesterol

La incorporación de [1,2- ^3H (N)]-Colesterol a la glándula adrenal se estudió mediante dos abordajes experimentales: "ex vivo" e "in vivo".

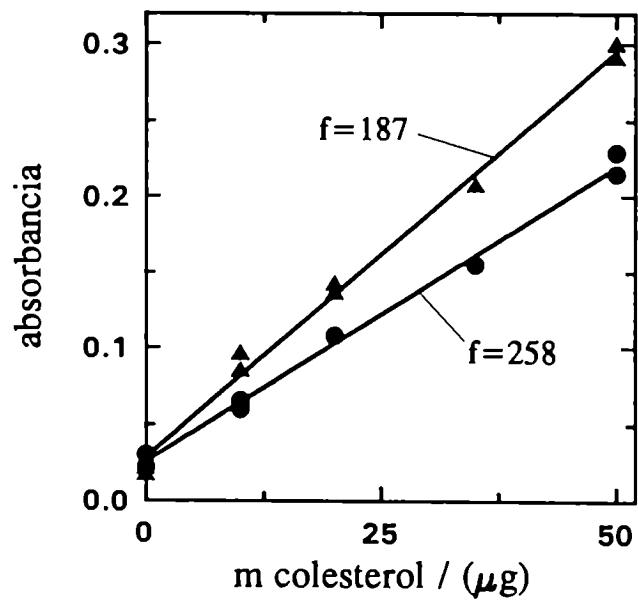


Figura 2.6: Curvas de calibración de colesterol

Se construyeron curvas de calibración utilizando, de acuerdo con el protocolo detallado en el texto. \blacktriangle : colesterol soluble y \bullet : colesterol llevado a residuo seco.

Incorporación "ex vivo": El ensayo consistió en incubar cuartos de glándulas adrenales o cápsulas y cores provenientes de animales infundidos con ET-1, en presencia de suero enriquecido en [^3H]-Colesterol. Las incubaciones se realizaron por duplicado en tubos de polipropileno en un baño termostatzado a 37°C. Primeramente, las glándulas se preincubaron con 0.45 ml de medio Ham F12 conteniendo 1 mg/ml de AMG (inhibidor de la reacción enzimática que convierte colesterol en pregnenolona) durante 15 minutos. Luego se agregó 50 μl del suero enriquecido en [1,2- ^3H (N)]-Colesterol (150000 dpm), continuando la incubación durante 30 minutos más. La reacción de incorporación se detuvo por transferencia del tejido a tubos limpios y realizando dos lavados sucesivos con 0.5 ml de solución fisiológica. A las muestras se les agregó solución centelleante, conteniendo 10% de Triton X 100 y se las contó en un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1214 Rackbeta). Los resultados se expresaron como dpm incorporadas/adrenal.

Incorporación "in vivo": Este ensayo consistió en infundir durante los primeros 4 minutos de la primera etapa de infusión (ver figura 2.1), 500 μl de suero enriquecido en [1,2- ^3H (N)]-Colesterol. Luego la infusión procedió según la descripción detallada en la sección 2.2.3 (en presencia o ausencia de ET-1 80 ng.(kg. de peso corporal) $^{-1}$.min $^{-1}$, a flujo=125 $\mu\text{l}/\text{min}$.). Finalizada la infusión, se extrajeron las adrenales y se cuantificó las dpm incorporadas en sendas zonas de la glándula adrenal.

Distribución subcelular del [^3H]-Colesterol: Estos ensayos se llevaron a cabo con el objeto de completar los estudios realizados sobre la distribución de colesterol endógeno mediada por ET-1. La descripción de la metodología utilizada en estos experimentos se encuentra detallada en la sección 2.3.4.

Preparación del suero enriquecido en [^3H]-Colesterol: La incorporación regulada de colesterol a células se realiza a través de lipoproteínas presentes en el suero. El tipo de lipoproteínas involucradas depende de la especie animal, siendo en la rata LDL ("low density lipoprotein"). La preparación de suero enriquecido en [1,2- ^3H (N)]-Colesterol se realizó de acuerdo con lo descrito por Avigan [251], con algunas modificaciones. Brevemente, se obtuvieron aproximadamente 6 ml de sangre por punción cardíaca de una rata previamente anestesiada con vapores de éter etílico. La sangre se incubó durante 3 horas a 37°C a fin de favorecer la formación del coágulo y obtener así el suero, de manera más eficiente. Luego, la sangre se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos. El suero obtenido se

incubó con [^3H]-Colesterol ($A_e = 50 \mu\text{Ci/nmol}$) durante toda la noche a 4°C . Finalizada la incubación, el suero enriquecido en [1,2- ^3H (N)]-Colesterol se guardó a -20°C hasta su utilización.

2.8 Medición de la Actividad de la Enzima Na^+/K^+ -ATPasa

La medición de la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa sensible a ouabaína se realizó mediante la comparación entre los niveles de fosfatos libres, resultantes de la hidrólisis de ATP, en presencia y en ausencia del inhibidor ouabaína [252,253].

A continuación se describen: el protocolo de incubación llevado a cabo para realizar la reacción enzimática y el método colorimétrico utilizado para la cuantificación de fosfatos libres producidos.

2.8.1 Protocolo de Incubación

El protocolo utilizado fue descrito por Philison y Edelman [252]. La reacción se llevó a cabo, por duplicado, en tubos de Kahn de polipropileno, en un volumen final de 1.05 ml en buffer L-Histidina 30 mM con la siguiente composición: NaCl 130 mM, KCl 20 mM, MgCl_2 3 mM y NaN_3 5 mM, de $\text{pH} = 7.5$.

Se ensayó la actividad de $50 \mu\text{l}$ de la preparación enzimática con ATP 3 mM, en presencia o ausencia de ouabaína 3 mM.

La incubación transcurrió durante 15 minutos en un baño termostático a 37°C , con agitación. Pasado ese tiempo, las muestras se transfirieron a un baño a 0°C , agregándose $167 \mu\text{l}$ de CCl_3COOH 30% y, luego de 10 minutos, 1 ml de H_2O desionizada fría. Las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos y los sobrenadantes obtenidos se guardaron para cuantificar los fosfatos producidos.

La determinación de los niveles de fosfatos endógenos se realizó, por duplicado, incubando cada muestra (con y sin ouabaína), en ausencia de ATP. La hidrólisis no enzimática se determinó, incubando el sustrato con y sin ouabaína, en ausencia de preparación enzimática.

2.8.2 Determinación de Fosfatos Libres

Se utilizó la técnica descrita por Ames [254]. Brevemente, las muestras se incubaron en tubos de Kahn de polipropileno con la mezcla de reacción que contenía: ácido ascórbico 1%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.7% y H_2SO_4 0.61 N. La reacción se dejó transcurrir durante 20 minutos a 45°C . Pasado ese tiempo, las muestras se leyeron contra un blanco de reactivo en un espectrofotómetro de doble haz, marca Shimadzu, modelo UV-3000, a la longitud de onda de 660 nm. La cuantificación se realizó mediante la comparación de las absorbancias de las muestras con las de una curva de calibración construida con HK_2PO_4 standard cuyo rango varió entre 0 y $80 \mu\text{mol}$.

Cálculos realizados para la determinación de la actividad enzimática: La actividad de la enzima buscada se determinó por la diferencia entre los valores de fosfato obtenidos de las incubaciones sin ouabaína (actividad de todas las ATPasas) y de las infusiones con ouabaína (actividad de las ATPasas insensibles al glicósido). Los resultados se expresaron como pmoles de PO_4^{-3} libres/mg de proteínas o como μmoles de PO_4^{-3} libres/adrenal, en los experimentos *in vivo* y como pmoles de PO_4^{-3} libres/ 10^5 cél. en los experimentos *in vitro*. Las proteínas se determinaron por el método de Bradford [220].

2.9 Medición de la Actividad de la Enzima Succínico Deshidrogenasa

La actividad de la enzima Succínico Deshidrogenasa (SDII) se utilizó como marcadora de la fracción mitocondrial. Dicha enzima se localiza en la membrana interna de la mitocondria.

El método empleado para su determinación fue descrito por Pennington [255]. Brevemente, se incubaron cada una de las fracciones subcelulares, por duplicado, durante 10 minutos a 37°C en presencia de succinato de sodio 50 mM, sacarosa 25 mM y violeta de p-nitrotetrazolio (INT) 0.1% p/v, en un volumen final de 1 ml de buffer $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{-2}$ 50 mM, de $\text{pH} = 7.4$.

La reacción se detuvo por agregado de CCl_3CHOOH 10%. Luego se agregó 4 ml de acetato de etilo, a fin de extraer el producto coloreado formado. Los tubos se agitaron, se centrifugaron y luego se leyó la absorbancia en la fase orgánica, a 490 nm, contra un blanco preparado en ausencia de succinato de sodio.

Se define una Unidad Enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que produce una absorbancia de 0.01 bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

2.10 Drogas y Solventes Generales

Las sales utilizadas para la preparación de los diferentes buffers fueron de calidad p.a.. El agua usada fue en la mayoría de los casos, destilada; en particular, se utilizó agua desionizada en las mediciones de actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa.

Los solventes utilizados para la extracciones de lípidos y las distintas corridas cromatográficas fueron de grado puro y los utilizados en el HPLC eran de calidad p.a.; todos los solventes fueron destilados y degaseados antes de su uso.

El tiopental sódico y la heparina utilizados eran de Lab. ABBOTT, Argentina.

Los esteroides ALDO, B, DOC, 18-OH-DOC, P_4 , P_5 y colesterol, el NADP y el malato de sodio (utilizados en las incubaciones con mitocondrias), el DMSO (de calidad útil para cultivos celulares), la Seroalbúmina Bovina y la Inmunoglobulina G (utilizadas en los RIA), el cAMP (utilizado como standard para el RIA), los standards de MAG, DAG, TAG, PI, PE y PC (utilizados en las cromatografías en capa delgada) y el succinato de sodio y violeta de p-nitrotetrazolio utilizados en la medición de la enzima SDII fueron de Sigma Chemicals.

Además, la mezcla centelleante empleada para el conteo de radiación β estaba compuesta por tolueno de grado puro, destilado antes de su uso, conteniendo 0.4% de PPO y 0.025% de dimetil-POPOP, ambos de Sigma Chemicals.

La colagenasa era de Worthington Biochemical Corp. (Freehold, NJ).

La trietilamina y el anhídrido acético utilizados para la reacción de acetilación del cAMP, eran marca Mallinkrodt y calidad p.a.

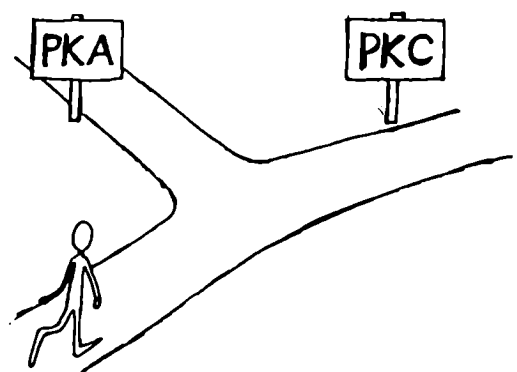
Las sustancias radioactivas fueron de New England Nuclear. El ^{125}I -NaI fue provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Las sustancias usadas en las mediciones de actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa eran de calidad p.a. y presentaban bajo contenido de fosfatos.

El KH_2PO_4 empleado como standard para la determinación de fosfatos libre era marca Merck y calidad p.a.

Capítulo 3

Mecanismo de Acción de ACTH



El presente capítulo comprende los resultados obtenidos a partir del estudio del mecanismo de acción de la hormona ACTH en el proceso de estimulación de la biosíntesis de esteroides.

Es bien sabido que ACTH estimula la esteroidogénesis a través de un incremento en los niveles de cAMP [144,145,146,147,36,148] (ver capítulo 1). Sin embargo, de acuerdo con las hipótesis planteadas por diferentes grupos de investigación [149,150,151,152,153,154, 155], existirían otras posibles vías alternativas y/o moduladoras de la vía de activación de la enzima adenililciclase, *i. e.* la activación de quinasas dependientes de DAG y/o de Ca^{++} -calmodulina.

En este trabajo se realizaron experimentos con el objeto de aportar evidencias acerca de la existencia de esas vías alternativas.

Los resultados se presentan en tres secciones: la primera agrupa aquellos datos obtenidos a partir de ensayos realizados con el péptido ACTH como hormona estimulante de la esteroidogénesis adrenal; la segunda sección se refiere específicamente a la acción de inhibidores de quinasas y la tercera comprende los resultados de los efectos producidos por sustancias que activan la vía de DAG, a fin de encontrar evidencias sobre la posible participación de otras quinasas, distintas a la proteína quinasa A (PKA), en la esteroidogénesis mediada por ACTH. En todos los casos se estudió la producción de esteroides (ALDO y B) y la producción de cAMP como respuesta biológica de células aisladas.

Medición de ALDO: La determinación de ALDO se realizó mediante la técnica de RIA, utilizando anticuerpos monoclonales [243]. La puesta a punto de la técnica consistió en: 1) comprobar la especificidad del anticuerpo mediante ensayos que cuantifican el porcentaje de reacción cruzada, 2) determinar el título del anticuerpo a usar y 3) comprobar la identidad estructural de ALDO inmunoreactiva.

La figura 3.1 presenta las curvas de desplazamiento obtenidas a partir de incubaciones realizadas en presencia de diferentes concentraciones de los esteroides: P_5 , P_4 , DOC, 18-OH-DOC, B y colesterol. Los porcentajes de reactividad cruzada se calcularon de acuerdo con la ecuación $R_c\% = EC_{50}(ALDO) \cdot 100 / EC_{50}(X)$, donde $EC_{50}(ALDO)$ y $EC_{50}(X)$ corresponden a las concentraciones de ALDO y del esteroide X ensayado, necesarias para desplazar el 50% de [3 -H]-ALDO unida al anticuerpo. Los resultados del ensayo de reactividad cruzada indican que el anticuerpo utilizado presenta una alta especificidad por ALDO¹.

El título del anticuerpo se determinó de acuerdo con la metodología descrita en la

¹DOC y P_4 presentaron 6.9 y 3.2%; los otros esteroides ensayados no superaron 0.6%.

sección 2.4.1; una dilución de 1/2000 se seleccionó de manera tal de conservar entre un 40-60% de la radioactividad total inicial, asociada al complejo antígeno-anticuerpo.

Por otro lado, a fin de comprobar la identidad estructural de ALDO inmunoreactiva determinada por esta técnica, se compararon, a partir de una muestra biológica, los niveles de ALDO detectados por RIA y por HPLC. En la tabla 3.1 se observa que la masa de ALDO inmunoreactiva es equivalente a la masa de ALDO cuantificada por HPLC, verificándose la confiabilidad de la técnica de RIA, en este sistema.

Medición de B y P₅: Ambos anticuerpos fueron cedidos gentilmente por el Dr. C.E. Gómez-Sánchez.

Para el caso particular del anticuerpo anti-B, se calculó el título del mismo de acuerdo con la metodología descrita en 2.4.1. Se seleccionó una dilución 1/600 de manera de conservar el 40-60% de la radioactividad total inicial asociada al complejo antígeno-anticuerpo.

El anticuerpo anti-P₅, se utilizó en una dilución 1/500.

Tabla 3.1: RIA vs HPLC

Técnica	ALDO (ng/ml)
RIA	36.4±0.9
HPLC directo	37.4±2.2
HPLC con 87% Recup.	42.9±2.5

3.1 Esteroidogénesis Mediada por ACTH

Primeramente se realizaron ensayos que consistieron en determinar la capacidad de respuesta de células de glomerulosa y de fasciculata ante el estímulo de diferentes concentraciones de ACTH, a fin de corroborar el buen funcionamiento del sistema a estudiar.

El contenido de ALDO producido en condiciones basales presentó diferencias comparando experimentos independientes, abarcando un rango entre 0.4 y 2.0 ng/10⁵ cél. Estas diferencias pueden deberse a diferentes estados hídricos y metabólicos de los animales. Cabe recordar que los niveles normales de ALDO plasmática pueden variar hasta un orden de magnitud entre un animal y otro.

La figura 3.2 muestra la curva de producción de ALDO en función de la concentración de ACTH presente. El contenido de ALDO presente en condiciones de no estimulación fue

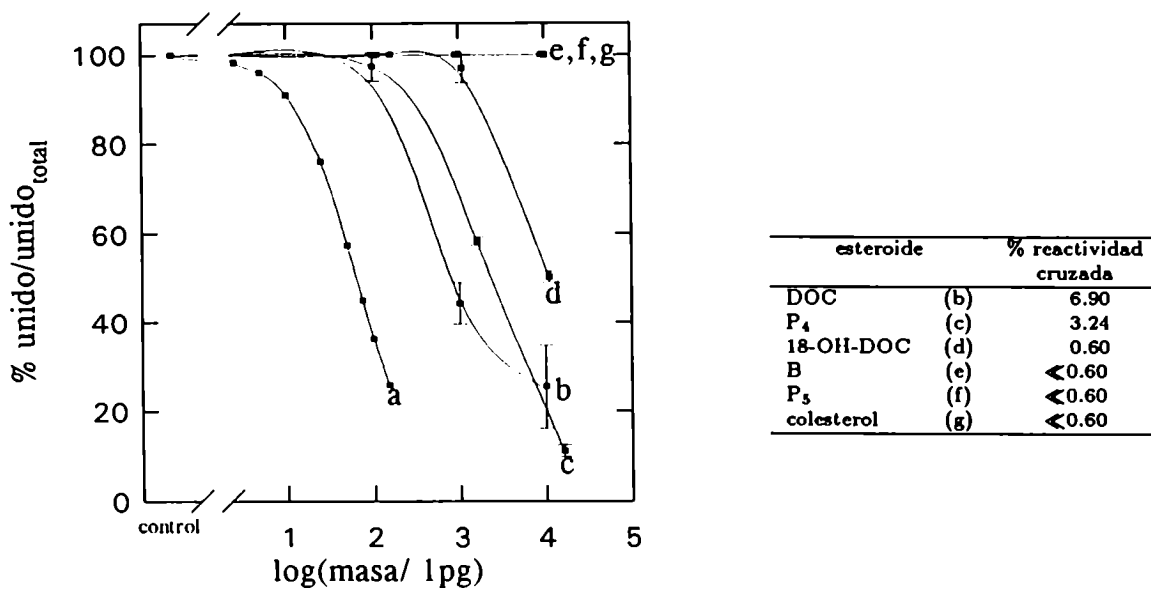


Figura 3.1: Ensayo de inmunoreactividad cruzada para el anticuerpo contra ALDO. Las curvas corresponden al desplazamiento de la unión Ac-[³H-ALDO] producido por la presencia de: (a) ALDO, (b) DOC, (c) P₄, (d) 18-OH-DOC, (e) B, (f) P₅ y (g) colesterol radioinertes.

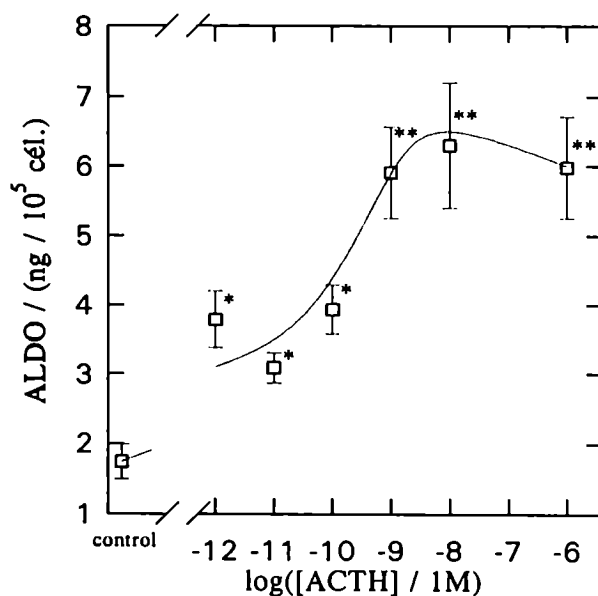


Figura 3.2: Curva de producción de ALDO vs concentración de ACTH

10^5 cél. de glomerulosa se incubaron durante 90 min. a 37°C en presencia de concentraciones de ACTH que abarcaron un rango entre 10^{-12} M y 10^{-6} M. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X ng de ALDO/ 10^5 cél. de 4 experimentos realizados por duplicado. La curva trazada esquematiza la tendencia observada experimentalmente. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$ con respecto al control (ANOVA).

igual a 1.74 ± 0.25 ng/ 10^5 cél. En la figura se observa que a partir de la concentración de ACTH 10^{-12} M la biosíntesis de ALDO es significativamente mayor que la correspondiente al tratamiento control (118%), alcanzándose una respuesta máxima entre 10^{-9} M y 10^{-8} M de ACTH (241%).

Por otro lado, ACTH estimula la producción de B tanto en preparaciones celulares de zona glomerulosa como de zona fasciculata. La figura 3.3 muestra la producción de B mediada por dos concentraciones diferentes de ACTH (10^{-10} M y 10^{-9} M), en sendas preparaciones celulares. Los valores de B determinados en condiciones de no estimulación fueron 21 ± 2 ng/ 10^5 cél. en células de glomerulosa y 15.2 ± 0.4 ng/ 10^5 cél. en células de fasciculata. La relación tratado/control máxima observada es igual a 6.29 y 6.84 en zona glomerulosa y fasciculata respectivamente.

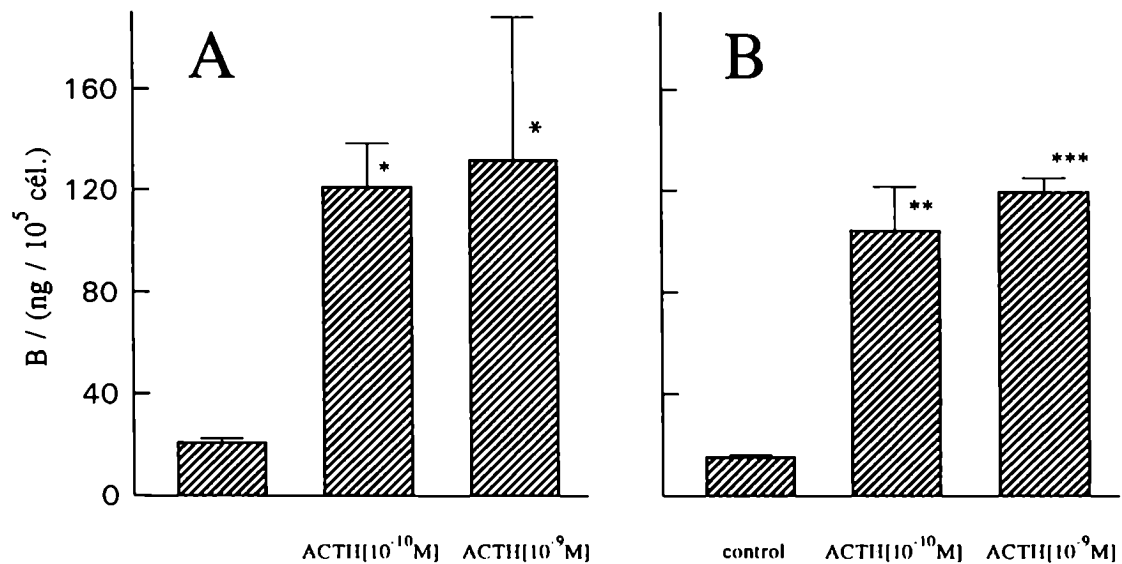


Figura 3.3: Producción de B mediada por ACTH

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C en presencia de ACTH 10⁻¹⁰ M y 10⁻⁹ M. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X ng de B/10⁵ cél. de 3 experimentos realizados por duplicado. Panel A: células de glomerulosa, panel B: células de fasciculata. *: p<0.05; **: p<0.02 y ***: p<0.0001 con respecto al control (ANOVA).

Ha sido descrito que ACTH presenta un poder esteroidogénico mucho mayor en zona fasciculata que en zona glomerulosa [256]; sin embargo, los resultados aquí presentados indicarían una similitud de potencia de ACTH sobre la estimulación de la producción de B en sendas zonas de la glándula adrenal. Una posible explicación a esta diferencia podría ser la existencia de contaminación entre ambos tipos celulares, dado que la preparación de células de glomerulosa se realizó a partir de cápsulas crudas. Por otro lado, la preparación de células de fasciculata se hizo a partir de adrenales decapsuladas. De todos modos, el estímulo de ACTH en células de fasciculata dá significancia con respecto al control con un p más bajo que el observado en células de glomerulosa.

ACTH también incrementa el contenido de cAMP; la figura 3.4 muestra el grado de estimulación obtenido al tratar las células con tres concentraciones diferentes de ACTH. El contenido de cAMP presente en células de glomerulosa en condiciones de no estimulación fue ligeramente diferente para los distintos ensayos realizados, abarcando un rango de concentraciones entre 0.75 y 2.8 pmoles/ 10^5 cél. ACTH incrementó ese valor de manera dosis dependiente, siendo la relación tratado/control máxima obtenida igual a 15 ± 2 .

3.2 Acción de Inhibidores de Quinasas

Una vez verificada la respuesta esteroidogénica de las células al estímulo de ACTH, se llevaron a cabo los estudios con inhibidores de quinasas. Los compuestos utilizados fueron 1-(5-Isoquinolinilsulfonil)2-Metil Piperazina (H_7) y Staurosporina (St). Ambas sustancias presentan una potencia inhibitoria mucho mayor por la familia de las proteínas quinasas C, siendo las correspondientes EC_{50} igual a 15 μ M y 2.7 nM, respectivamente.

La tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos a partir de incubaciones de células de glomerulosa con ACTH 10^{-9} M en presencia de St 1.6 nM y H_7 100 μ M. El nivel basal de ALDO determinado en estos experimentos fue igual a 1.50 ± 0.14 ng/ 10^5 cél; ACTH incrementó la producción de ALDO un 200%. Pero la presencia de los inhibidores de quinasas redujo la producción de ALDO mediada por ACTH, siendo el porcentaje de inhibición obtenido igual a 56% y 86% para St y H_7 respectivamente. Por otro lado, ninguna de las dos sustancias empleadas modificó los niveles de ALDO con respecto al tratamiento control.

En la figura 3.5 se describen las curvas correspondientes al efecto inhibitorio de la producción de ALDO (panel A) y B (panel B) provocado por la presencia de diferentes concentraciones de St en células estimuladas con ACTH 10^{-9} M. Como St se encontraba

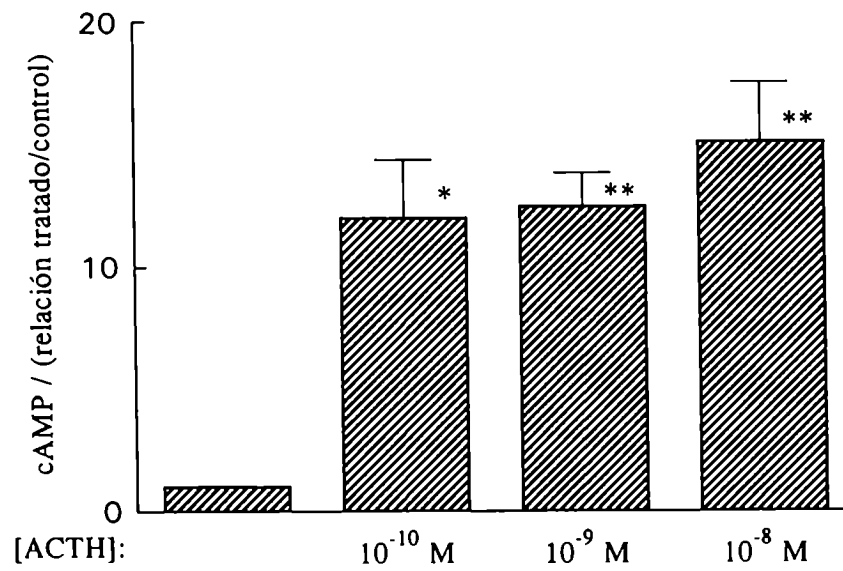


Figura 3.4: Incremento de cAMP mediado por ACTH

10^5 cél. de glomerulosa se incubaron durante 90 min. a 37°C en presencia de ACTH 10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de 2 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Tabla 3.2: Efecto de H_7 y St sobre la producción de ALDO mediada por ACTH

Tratamiento	ALDO / (ng/10 ⁵ cél.)		
	—	St 1.6 nM	H_7 100 μ M
Control	1.50±0.14	2.03±0.14	1.05±0.06
ACTH 10 ⁻⁹ M	4.54±0.35 ^a	2.86±0.19 ^b	1.92±0.20 ^b

10⁵ cél. de zona glomerulosa se incubaron durante 90 minutos con ACTH 10⁻⁹ M, en presencia o ausencia de H_7 o St; ACTH fue agregado a la mezcla de incubación 15 minutos después que los inhibidores de quinasas. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X los ng de ALDO/10⁵ cél de 2 experimentos realizados por duplicado. a: $p < 0.02$, con respecto al control; b: $p < 0.05$ con respecto a los tratamientos sin ACTH y sin inhibidor.

disuelta en DMSO, se agregó en todas las condiciones una cantidad de este solvente equivalente a la presente en los incubados con la máxima concentración de St (1.6 μ M). Igualmente la concentración de DMSO utilizada en ningún caso superó el 0.2%. Los niveles de ALDO obtenidos en presencia de DMSO no fueron diferentes al tratamiento control en ninguno de los experimentos realizados (la relación DMSO/control fue igual a 1.12±0.08). Los niveles basales de ALDO y B fueron 0.52±0.1 ng/10⁵ cél. y 5.88±0.51 ng/10⁵ cél., respectivamente. ACTH estimuló la producción de esteroides en un grado igual a 5.77 y 9.7, respectivamente.

En el panel A de la figura 3.5 se observa que a partir de St 50 pM hay una inhibición significativa en la producción de ALDO (31%), alcanzándose el 60% de inhibición con la concentración de St 1.6 nM. Dosis mayores de St (del orden de micromolar) provocan el 100% de inhibición. St sola, no modifica los niveles basales de ALDO.

Por otro lado, St también inhibe de manera dosis dependiente la producción de B mediada por ACTH en células de fasciculata (panel B). Esta inhibición se hace significativa, con respecto al tratamiento con ACTH, a partir de la concentración de St 1.6 nM (51%), alcanzando un porcentaje de disminución del efecto de ACTH igual a 86% con la concentración de St 1.6 μ M. St sola no modifica los niveles basales de B.

La inhibición provocada por St pareciera afectar en menor grado la esteroidogénesis mediada por ACTH en las células de fasciculata que en las células de glomerulosa. Comparando ambos paneles se observa que el EC₅₀ de St para la inhibición de la producción de ALDO es ligeramente inferior (aproximadamente 500 pM) al EC₅₀ observado para la

inhibición de la producción de B (1.6 nM). Además, la concentración de St 1.6 μ M inhibe totalmente la producción de ALDO mediada por ACTH pero no llega a bloquear en forma total el efecto de esta hormona sobre la producción de B ($p < 0.05$, para el tratamiento ACTH+St 1.6 μ M con respecto al tratamiento con St 1.6 μ M, ANOVA).

El fundamento de medir la respuesta esteroideogénica en ambas zonas de la glándula adrenal radica en el hecho de que sendas zonas responden en forma diferente a los reguladores extracelulares. La biosíntesis de glucocorticoides en zona fasciculata es regulada principalmente en el paso temprano (pasaje de colesterol a P_5), siendo menos influyente la regulación del paso tardío. Por otro lado la producción de ALDO es controlada por múltiples factores que actúan tanto sobre el paso temprano como en el paso final de la formación del esteroide [8].

La actividad de los citocromos mitocondriales involucrados en la biosíntesis de esteroides (citocromo P-450_{SCC} y citocromos P-450_{11 β}) es controlada por medio de fosforilaciones y desfosforilaciones (ver capítulo 1) [94]. Si bien la actividad de dichos citocromos se ve afectada por la presencia de St, el hecho de encontrar una sensibilidad diferente a la acción de St en ambos tipos celulares, sugiere que la acción del inhibidor de quinasas afectaría principalmente el último paso de la biosíntesis de ALDO, específicamente a partir de B. Así, la isoenzima P-450_{11 β} responsable de la biosíntesis de ALDO, en adrenal de rata, que además está localizada sólo en la zona glomerulosa ([8] y sus ref.) sería más susceptible a ser modulada por quinasas sensibles a St.

Dado que el principal mecanismo de estimulación de la producción de esteroides mediada por ACTH es la vía del cAMP, se decidió investigar el efecto de St sobre el contenido de ese nucleótido cíclico. La figura 3.6 esquematiza los porcentajes de estimulación obtenidos a partir de incubaciones de células de glomerulosa con ACTH 10^{-9} M en presencia de diferentes concentraciones de St. Se define como 100% de estimulación al incremento en el contenido de cAMP observado al tratar las células con ACTH en ausencia de inhibidor. En la figura se observa que St ejerce un efecto bifásico; a dosis bajas inhibe la estimulación provocada por ACTH —esta inhibición se hace significativa con la concentración de St 160 pM, llegando sólo a 66% de estimulación— y alcanza un punto de inflexión con la concentración de St 16 nM (51% de estimulación). Luego, a medida que incrementa la dosis de St (hasta 1.6 μ M), el contenido de cAMP aumenta, alcanzando un valor que no difiere del tratamiento sin St (103% de estimulación).

Los efectos producidos por las concentraciones altas de St descartan la posibilidad de que esa sustancia pudiera provocar un daño celular, dado que si bien los niveles de ALDO

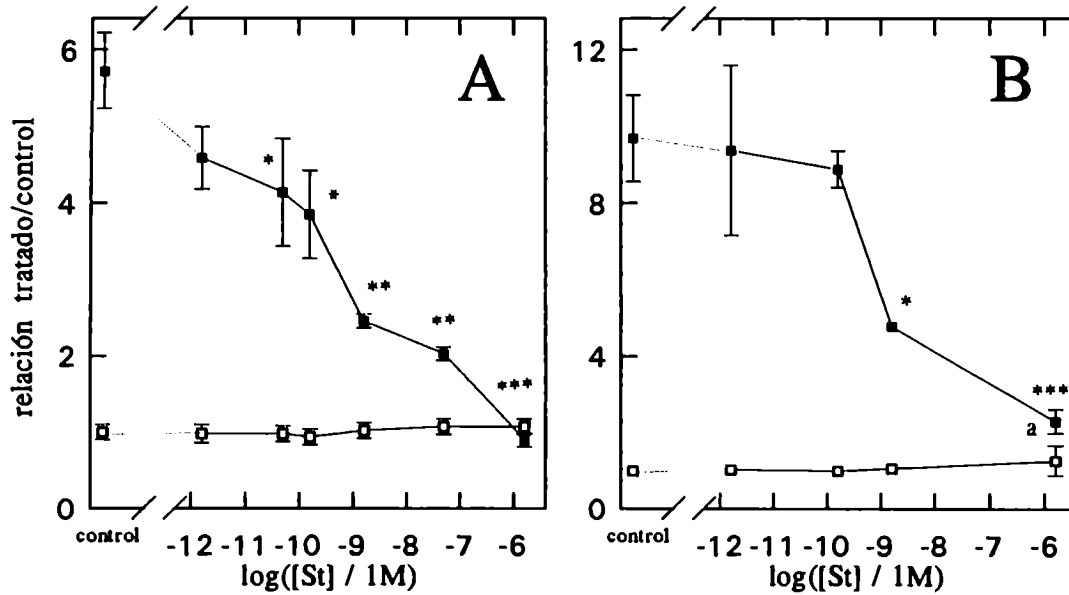


Figura 3.5: Efecto de Staurosporina sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH. 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con ACTH 10^{-9} M en presencia de diferentes concentraciones de St. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X la relación tratado/control determinadas a partir de la medición de cada esteroide. Panel A: producción de ALDO en cél. de glomerulosa, panel B: producción de B en cél. de fasciculata. □: sin ACTH, ■: con ACTH. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.02$ y ***: $p < 0.01$ con respecto al tratamiento sin St. (a): $p < 0.05$ con respecto al tratamiento sin ACTH (ANOVA)

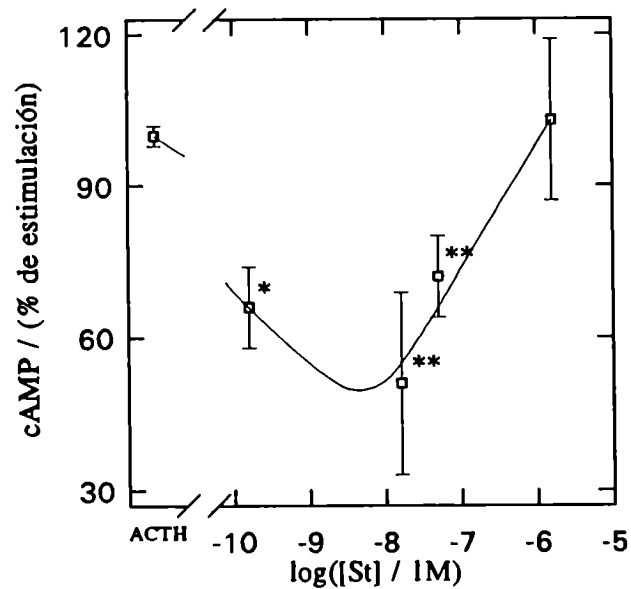


Figura 3.6: Efecto de St. sobre la producción de cAMP mediada por ACTH 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con ACTH 10^{-9} M en presencia de diferentes concentraciones de St. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X el porcentaje de estimulación con respecto al tratamiento control. * $p < 0.02$ y ** $p < 0.05$ con respecto al tratamiento con ACTH (ANOVA). La producción de cAMP basal fue igual a 1.51 ± 0.25 pmol/ml. La curva trazada esquematiza la tendencia observada experimentalmente.

obtenidos en las incubaciones con ACTH 10^{-9} M + St $1.6 \mu\text{M}$ son comparables a los del tratamiento control, el contenido de cAMP mediado por ACTH 10^{-9} M es similar en presencia o en ausencia de St $1.6 \mu\text{M}$.

Los resultados observados a partir de las mediciones de ALDO y cAMP sugieren por un lado que concentraciones de St del orden de 10 nM podrían ejercer alguna acción que afecte directamente el contenido de cAMP y en consecuencia los niveles de ALDO. Además, concentraciones de St del orden de $1 \mu\text{M}$ podrían afectar algún evento posterior a la producción de cAMP.

Se estudió entonces, el efecto de St sobre la producción de ALDO mediada por dibutiril-cAMP (diBu-cAMP). Para ello se realizaron curvas de contenido de ALDO vs concentraciones crecientes de St, en presencia de diBu-cAMP 1 mM. La figura 3.7 muestra los resultados obtenidos. La producción de ALDO mediada por el nucleótido cíclico incrementó de $0.52 \pm 0.10 \text{ ng}/10^5 \text{ cél.}$ (control) a $1.75 \pm 0.09 \text{ ng}/10^5 \text{ cél.}$ (tratadas con diBu-cAMP). St no provocó modificación alguna sobre los niveles de ALDO mediados por diBu-cAMP hasta la concentración 50 nM. Sin embargo, la concentración de St $1.6 \mu\text{M}$ inhibió el efecto de diBu-cAMP un 100%. Estos resultados sugieren que de ser inhibida PKA, lo sería por efecto de concentraciones de St del orden de $1 \mu\text{M}$. Entonces se reafirmaría que la acción inhibitoria de bajas concentraciones de St sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH podría localizarse en un evento anterior y/o independiente de la producción de cAMP.

Estos resultados son consistentes con los presentados por otros investigadores [99]. Elliot *et al.* mostraron que bajas concentraciones de St inhiben la producción de ALDO mediada por A II sin afectar la producción de ALDO mediada por cAMP [99].

De esta manera, el uso de bajas y altas concentraciones de St evidencian una diferencia de efectos entre ACTH y cAMP, sugiriendo que en el mecanismo de acción de ACTH estaría(n) involucrada(s) otra(s) quinasa(s) distinta(s) a PKA.

Ha sido descrito que ACTH provoca la respuesta adrenal a través de la interacción con dos subpoblaciones de receptores (ver sección 1.3 en el capítulo 1). Li *et al.* demostraron que mientras el fragmento de ACTH₁₋₂₄ provoca la misma respuesta que la hormona entera, los fragmentos ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄ estimulan en menor proporción la producción de cortisol cuando actúan en forma separada, recuperando la estimulación completa cuando son incubados juntos, sugiriendo que ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄ se unen a poblaciones de receptores diferentes [155].

Con el objeto de analizar si St provoca un efecto diferencial en la aldosteronogénesis mediada por cada uno de estos fragmentos se realizaron incubaciones de células de glo-

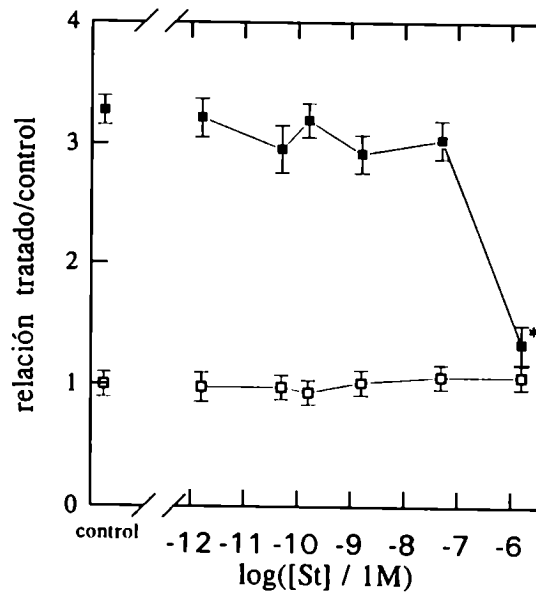


Figura 3.7: Efecto de St. sobre la esteroidogénesis mediada por diBu-cAMP
 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con diBu-cAMP 1 mM en presencia de diferentes concentraciones de St. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas de 3 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.02$ con respecto al tratamiento en ausencia de St (ANOVA). □: sin diBu-cAMP, ■: con diBu-cAMP.

merulosa con ACTH 10^{-9} M, ACTH₁₋₁₀ 10^{-7} M y ACTH₁₁₋₂₄ 10^{-7} M en presencia de St 16 nM y 1.6 μ M. La figura 3.8 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de los niveles de ALDO medidos. El contenido basal de ALDO determinado fue 1.17 ± 0.09 ng de ALDO/ 10^5 cél. Mientras ACTH aumentó 4.2 veces la producción de ALDO con respecto al tratamiento control, ACTH₁₋₁₀ lo hizo 2.1 veces y ACTH₁₁₋₂₄ 1.5 veces. Si bien la presencia de St 1.6 μ M bloqueó completamente la acción estimuladora de los tres péptidos, la concentración de St 16 nM inhibió cada estímulo de manera diferente. La aldosteronogénesis mediada por ACTH y por ACTH₁₁₋₂₄ es disminuída significativamente por la presencia del inhibidor de quinasas, siendo los porcentajes de inhibición 54% y 81% para ACTH y ACTH₁₁₋₂₄, respectivamente. Sin embargo, la producción de ALDO mediada por ACTH₁₋₁₀ es levemente modificada por la presencia de St 16 nM (relación ACTH₁₋₁₀+St/control = 1.8), siendo el porcentaje de inhibición igual a 30%.

Estos resultados indican que la quinasa sensible a concentraciones bajas de St estaría mediando la acción aldosteronogénica de ACTH a través de la interacción con la subpoblación de receptores que también une ACTH₁₁₋₂₄. Además, es sabido por bibliografía que ACTH₁₋₁₀, pero no ACTH₁₁₋₂₄, es capaz de aumentar la formación de cAMP [155]. Así, la ligera disminución de la aldosteronogénesis mediada por ACTH₁₋₁₀ provocada por St 16 nM apoya los resultados observados en las figuras 3.5 y 3.6. De esta manera la(s) otra(s) quinasa(s) (distinta(s) a PKA involucrada(s) en la esteroidogénesis mediada por ACTH tendría(n) una acción *per se* y/o actuaría(n) modulando la formación de cAMP.

A partir de este punto se utilizó a St como herramienta para investigar sistemas de señales distintos a cAMP-PKA en el mecanismo de acción de ACTH. En particular, se analizó por un lado el efecto de concentraciones bajas de St (16 nM) y por el otro, el efecto de concentraciones altas, (1.6 μ M).

3.2.1 Efecto de Bajas Concentraciones de Staurosporina

El efecto de bajas cocentraciones de St sobre la aldosteronogénesis mediada por ACTH fue observado para concentraciones de la hormona que abarcaron un rango entre 10^{-12} M y 10^{-8} M. La figura 3.9 muestra la curva que corresponde a la producción de ALDO *vs* la concentración de ACTH, en presencia o ausencia de St 16 nM (tomada como concentración representativa de las concentraciones bajas, ver figura 3.5). La producción de ALDO en condiciones de no estimulación arrojó un valor de 0.69 ± 0.02 ng/ 10^5 cél. ACTH estimuló de manera dosis dependiente alcanzando una relación tratado/control máxima igual a

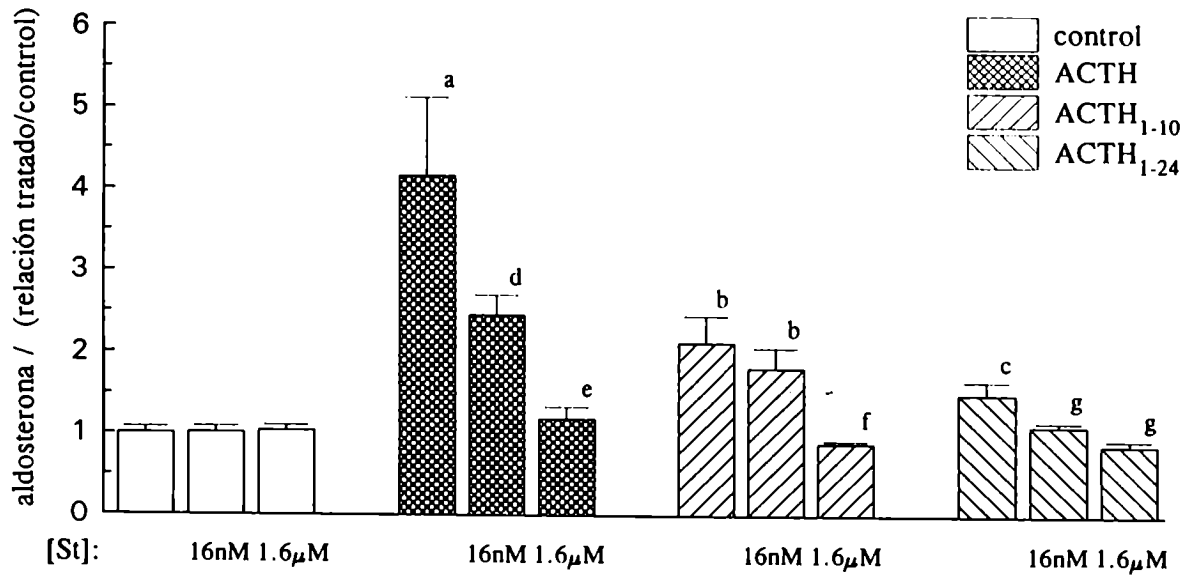


Figura 3.8: Efecto de St. sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄ 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con ACTH 10^{-9} M, ACTH₁₋₁₀ 10^{-7} M y ACTH₁₁₋₂₄ 10^{-7} M, en presencia o ausencia de St 16 nM y $1.6 \mu\text{M}$. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas de 1 experimento representativo de 3. a: $p < 0.01$ con respecto al control, b: $p < 0.02$ con respecto al control, c: $p < 0.05$ con respecto al control, d: $p < 0.05$ con respecto a ACTH, e: $p < 0.01$ con respecto a ACTH y $p < 0.02$ con respecto a ACTH+St (16 nM), f: $p < 0.02$ con respecto a ACTH₁₋₁₀ y g: $p < 0.05$ con respecto a ACTH₁₁₋₂₄, (ANOVA).

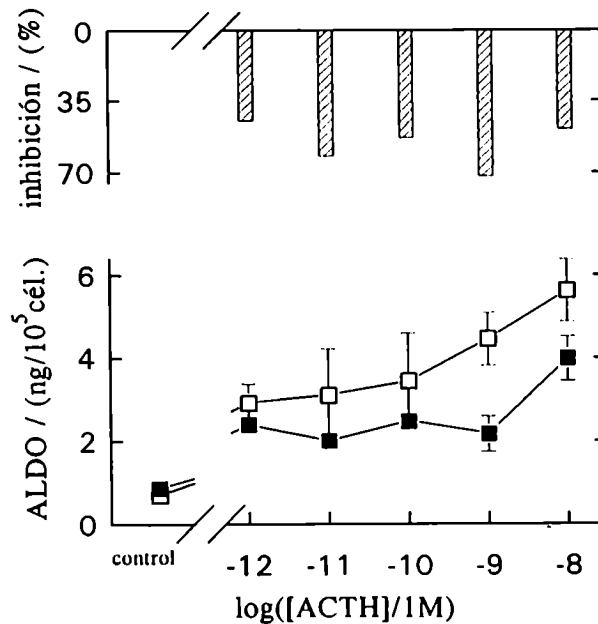


Figura 3.9: Curva dosis respuesta en presencia de 16 nM de St 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con St 16 nM en presencia de diferentes concentraciones de ACTH. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X ng de ALDO/ 10^5 cél. □: sin St, ■: con St. En la parte superior se encuentran esquematizados los porcentajes de inhibición producidos por la presencia de St, calculados a partir de los valores de ALDO obtenidos para cada concentración de ACTH ensayada.

8.14 para una concentración de ACTH 10^{-8} M.

St no sólo provoca una disminución de la respuesta máxima al estímulo con ACTH 10^{-8} M, sino que también pareciera afectar el EC_{50} de la hormona aumentándolo notablemente. Por otro lado, St ejerció un mayor poder inhibitorio sobre la concentración de ACTH 10^{-9} M (72% de inhibición con respecto al tratamiento con ACTH). De esta manera, la putativa quinasa inhibible por bajas concentraciones de St modularía positivamente la respuesta esteroidogénica a ACTH.

De acuerdo con los resultados presentados en las figuras 3.6 y 3.7, el blanco del efecto de esa dosis de St se ubicaría en algún punto entre la interacción de ACTH con su receptor específico y la activación de la adeniliclasa; o bien, St podría provocar una activación de

la enzima fosfodiesterasa (que participa en la conversión de cAMP en 5'(OH)-AMP)². Con el objeto de considerar estas dos posibilidades se llevaron a cabo incubaciones de células de glomerulosa con diferentes agentes estimuladores de la vía del cAMP, en presencia o ausencia de St 16 nM.

La tabla 3.3 presenta los resultados obtenidos a partir de esas incubaciones. ACTH, diBu-cAMP, forskolina (FK) y toxina del Cólera (CT) estimulan significativamente la producción de ALDO. St sólo inhibe la producción de ALDO mediada por ACTH (2.83 ± 0.19 ng/10⁵ cél. para el tratamiento con ACTH + St vs 4.54 ± 0.35 ng/10⁵ cél. para el tratamiento con ACTH) y por CT (2.35 ± 0.07 ng/10⁵ cél. para el tratamiento con CT + St vs 3.10 ± 0.18 ng/10⁵ cél. para el tratamiento con CT). Por otro lado, St no modifica los valores de ALDO provocados por el agregado de concentraciones máximas y submáximas de FK y de diBu-cAMP.

Tabla 3.3: Acción inhibitoria de St sobre la aldosteronogénesis mediada por CT, FK y diBu-cAMP.

Tratamiento	ALDO / (ng/10 ⁵ cél.)	
	—	St 16 nM
Control (7)	1.50 ± 0.14	2.03 ± 0.14
ACTH 10 ⁻⁹ M (5)	4.54 ± 0.35	$2.86 \pm 0.19^*$
diBu-cAMP 1 mM (3)	4.89 ± 0.35	5.34 ± 0.07
diBu-cAMP 0.2 mM (3)	3.83 ± 0.40	4.35 ± 0.76
FK 10 μ M (3)	3.17 ± 0.27	2.87 ± 0.07
FK 4 μ M (2)	2.65 ± 0.10	2.68 ± 0.22
CT 1 μ g/ml (2)	3.10 ± 0.18	$2.35 \pm 0.07^*$

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con St 16 nM en presencia de ACTH, CT, FK y diBu-cAMP en las concentraciones indicadas en la tabla. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X ng de ALDO/10⁵ cél. Los números entre paréntesis indican los experimentos realizados por duplicado.*: p<0.05 con respecto al tratamiento sin St.

Dado que se sabe que FK estimula la enzima adenililciclase por medio de una interacción con la misma, los resultados aquí presentados sugieren, entonces, que el efecto inhibitorio de bajas concentraciones de St sobre la formación de ALDO mediada por

²Para mayor claridad ver el esquema de la figura de la página 19.

ACTH, no sería a través de una acción directa sobre la ciclasa.

Por otro lado, la posibilidad de que St estuviera activando la fosfodiesterasa, queda descartada por el hecho de que la presencia del inhibidor no afecta los niveles de ALDO producidos por ninguna de las dos concentraciones de FK utilizadas.

Las mediciones realizadas sobre el contenido de cAMP obtenido a partir de las incubaciones de células de glomerulosa, son coherentes con los resultados observados para la producción de ALDO. La presencia de St disminuye el efecto estimulador causado por ACTH (7.8 ± 2.8 pmoles/ 10^5 cél. vs 15.2 ± 1.5 pmoles/ 10^5 cél. para el tratamiento con ACTH solo), y el mediado por CT (2.40 ± 0.35 pmoles/ 10^5 cél. vs 5.35 ± 1.45 pmoles/ 10^5 cél. para el tratamiento con CT).

Los resultados aquí presentados sugieren que St estaría provocando por los menos alguna modificación en la activación o en el acople de alguna proteína G, dado que la estimulación de la biosíntesis de ALDO y la producción de cAMP mediada por CT es afectada por la presencia del inhibidor de quinasas.

Varios investigadores han reportado que tanto la subunidad β como la subunidad α_i de las proteínas G son sustrato de diferentes quinasas, en particular de PKC [57,58]. Sin embargo, los estudios realizados con toxina de Pertussis (no presentados aquí) no mostraron diferencias que pudieran llevar a una conclusión al respecto.

3.2.2 Efecto de Altas Concentraciones de Staurosporina

Como se muestra en la figura 3.5, las concentraciones de St del orden de $1 \mu\text{M}$ provocan el 100% de inhibición en la biosíntesis de ALDO mediada por ACTH.

La tabla 3.4 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de los valores de ALDO y cAMP determinados en incubaciones realizadas con CT $1 \mu\text{g/ml}$, FK $10 \mu\text{M}$ y diBu-cAMP 1 mM , en ausencia y en presencia de St $1.6 \mu\text{M}$.

CT, FK y diBu-cAMP provocaron incrementos significativos sobre el contenido de ALDO y cAMP. El porcentaje de estimulación en la producción de ALDO mediada por los tres agentes se redujo significativamente debido a la presencia de St. Los porcentajes de inhibición provocados por St son 95%, 94% y 91% para CT, FK y diBu-cAMP, respectivamente. Sin embargo, el nivel de cAMP no fue modificado o fue incrementado, por la presencia del inhibidor de quinasas.

Estos valores de cAMP sugieren dos posibilidades: una de ellas es que esté aumentada la producción de cAMP debido a una actividad mayor de la enzima adenililciclase; la

Tabla 3.4: Efecto de St 1.6 μ M

Tratamiento	ALDO / (tratado/control)		cAMP / (tratado/control)	
	—	St 1.6 μ M	—	St 1.6 μ M
Control (7)	1.00 \pm 0.20	1.12 \pm 0.06	1.00 \pm 0.01	1.28 \pm 0.18
CT 1 μ g/ml (2)	2.08 \pm 0.12	1.18 \pm 0.06 ^a	1.91 \pm 0.52	1.43 \pm 0.27
FK 10 μ M (3)	4.19 \pm 0.27	1.35 \pm 0.15 ^a	4.59 \pm 1.25	12.14 \pm 3.31
diBu-cAMP 1 mM (3)	3.24 \pm 0.20	1.34 \pm 0.16 ^b	—	—

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con St 1.6 μ M en presencia de ACTH, CT, FK y diBu-cAMP en las concentraciones indicadas en la tabla. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X las relaciones tratado/control determinadas a partir de la cuantificación de ALDO y cAMP. Los valores entre paréntesis indican el número de experimentos realizados por duplicado. a: $p < 0.01$ y b: $p < 0.02$, con respecto al tratamiento sin St.

otra posibilidad es que St esté provocando la inhibición de alguna fosfodiesterasa (que convierte a cAMP en 5'(OH)-AMP).

Se realizaron, entonces, experimentos con células de glomerulosa estimuladas con ACTH 10⁻⁹ M, en presencia o ausencia de St 1.6 μ M y/o de un conocido inhibidor de fosfodiesterasas, metil-isobutil-xantina (MIX) 30 μ M.

Si St estuviese provocando de alguna manera una mayor actividad de la ciclasa, la presencia de MIX, que inhibe la degradación del nucleótido, provocaría un aumento aún mayor en el contenido de cAMP. Así, el nivel de cAMP producido por la presencia de St y MIX juntos sería equivalente a la suma de los niveles de cAMP obtenidos cuando ambos agentes son incubados por separado. Por el contrario, si St inhibiera la degradación de cAMP a través de algún mecanismo común (al menos en parte) al de MIX, entonces el contenido del nucleótido obtenido por la presencia de ambos agentes juntos no debería ser diferente a los niveles producidos por cada una de esas sustancias por separado.

La tabla 3.5 muestra los resultados de esas incubaciones; ACTH y ACTH+MIX estimulan significativamente la producción de ALDO (5.52 y 5.32, respectivamente) y cAMP (13.66 y 15.80, respectivamente) con respecto al tratamiento control. La presencia de St 1.6 μ M disminuye significativamente la producción de ALDO mediada por ACTH (98% de inhibición) y por ACTH+MIX (87% de inhibición).

Por otro lado, el agregado de MIX aumenta ligeramente los valores de cAMP me-

diados por ACTH (relación tratado/control 8.8 para ACTH+MIX vs 7.6 para ACTH). La presencia de St también aumenta ligeramente la producción de cAMP mediada por ACTH (relación tratado/control 9.5 para ACTH+St). Sin embargo, el efecto provocado por el agregado de los dos agentes juntos no difiere de los observados en incubaciones realizadas con cada uno de estos agentes por separado (relación tratado/control ACTH + St + MIX = 9.8).

Tabla 3.5: Acción de St y MIX sobre la respuesta adrenal a ACTH

Tratamiento	ALDO / (ng/10 ⁵ cél.)		cAMP / (pmol/10 ⁵ cél.)	
	—	St 1.6 μ M	—	St 1.6 μ M
Control	0.51 \pm 0.06	0.58 \pm 0.04	0.90 \pm 0.25	1.14 \pm 0.05
MIX 30 μ M	0.52 \pm 0.05	0.54 \pm 0.10	0.88 \pm 0.15	1.06 \pm 0.10
ACTH 10 ⁻⁹ M	2.76 \pm 0.35 ^a	0.62 \pm 0.03 ^b	6.83 \pm 0.51 ^d	9.10 \pm 0.40 ^e
ACTH + MIX	2.66 \pm 0.01 ^a	0.90 \pm 0.08 ^c	7.90 \pm 0.40 ^d	8.80 \pm 0.15 ^e

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con ACTH en presencia o ausencia de St y/o MIX en las concentraciones indicadas. Los valores corresponden a dos experimentos llevados a cabo por duplicado. a: p<0.01 con respecto al control, b: p<0.02 con respecto a ACTH, c: p<0.001 con respecto a ACTH+MIX y p<0.05 con respecto a ACTH, d: p<0.001 con respecto al control y e: p<0.05 con respecto a ACTH.

De acuerdo con las dos hipótesis planteadas arriba, los resultados aquí presentados sugieren que MIX y St podrían estar aumentando el nivel de cAMP por una vía común.

3.3 Acción de Activadores de PKC

Los resultados que se muestran en esta sección corresponden a ensayos realizados con el objeto de estudiar la aldosteronogénesis mediada por sustancias que directa o indirectamente regulan la actividad de PKC.

La regulación fisiológica de la enzima es por medio del DAG producido por la hidrólisis de fosfolípidos mediada por PLC [257,258] o por síntesis *de novo* [161]. Así, cualquier estímulo que consista en aumentar el contenido de DAG en la célula, provocará una activación de PKC.

En este trabajo se eligieron tres modos diferentes para llevar adelante un aumento en el contenido de DAG intracelular. Por un lado se realizaron experimentos incubando

células de glomerulosa en presencia de un análogo permeable de DAG, el 1,2-dioctanoil-sn-glicerol. El segundo abordaje consistió en tratar a las células con PLC exógena, a fin de provocar la hidrólisis de los lípidos de membrana y así incrementar la formación de DAG. Por último, se llevaron a cabo incubaciones con R₅₉₀₂₂. Este compuesto ha sido descrito como un potente inhibidor de la enzima DAG-quinasa [235]. El agregado de R₅₉₀₂₂ provoca un incremento en el contenido de DAG endógeno debido a que impide su metabolización a ácido fosfatídico.

Finalmente se realizaron incubaciones con 1,3-miristato-13-acetato de forbol (PMA). El tratamiento prolongado con ésteres de forbol provoca una continua y potente traslocación de la PKC de citosol a membrana y así la degradación de la enzima y la imposibilidad de una activación posterior (entendida como traslocación)(ver capítulo 1) [90]. De esta manera se estudió el efecto de la depleción de PKC sobre la producción de ALDO.

Esta metodología ha sido intensamente utilizada en diversos sistemas [228,75,229,230,240,98].

3.3.1 Efecto de DAG sobre la Aldosteronogénesis

Se realizaron incubaciones de células aisladas en presencia de tres concentraciones diferentes de DAG: 25 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$ durante 90 minutos a 37°C. La figura 3.10 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de los valores de ALDO determinados. Dado que el solvente de DAG fue DMSO, los valores de ALDO obtenidos se refirieron al tratamiento con DMSO. Además, la concentración del solvente en ningún momento superó el valor de 0.2%. ALDO medida en el tratamiento con DMSO no fue significativamente diferente a la obtenida con el verdadero control, $0.57 \pm 0.06 \text{ ng}/10^5 \text{ cél.}$ y $0.64 \pm 0.05 \text{ ng}/10^5 \text{ cél.}$, respectivamente.

Todas las concentraciones de DAG ensayadas, aumentaron significativamente el contenido de ALDO, siendo las relaciones tratado/control igual a 1.51 para 25 $\mu\text{g/ml}$, 1.92 para 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1.84 para 500 $\mu\text{g/ml}$.

De acuerdo con los resultados obtenidos, existiría un aumento en la producción de ALDO mediado por DAG, aunque este incremento es mucho menor al provocado por ACTH. Además, el contenido de cAMP determinado en incubaciones realizadas en presencia de DAG 100 $\mu\text{g/ml}$ no difirió del nivel basal (relación tratado/control = 0.90 ± 0.03).

Estos resultados fueron también observados por Lobo *et al.*, quienes reportaron que la presencia de análogos permeables de DAG, como el 1,2-dioctanoil-sn-glicerol y el octanoil-

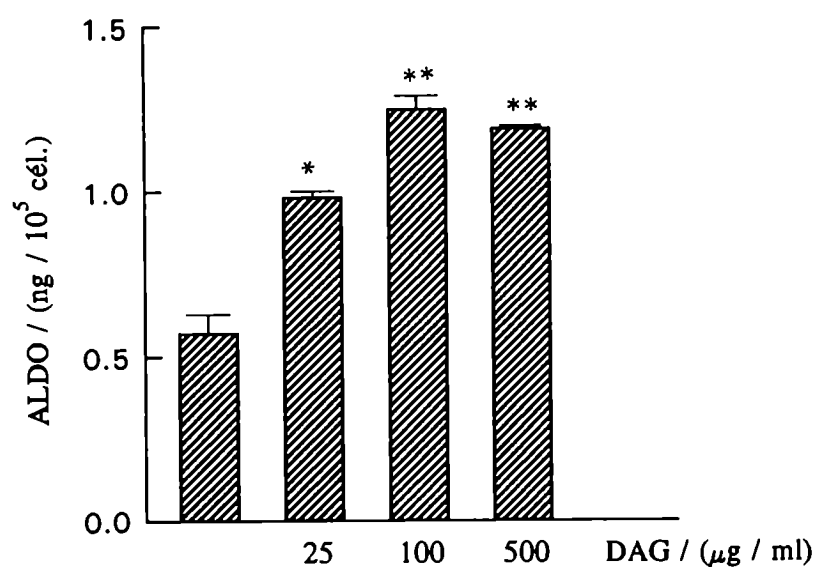


Figura 3.10: Producción de ALDO mediada por DAG

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C en presencia de tres concentraciones diferentes de DAG (1,2-dioctanil-sn-glicerol). Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X los ng/10⁵ cél. Los datos corresponden a un experimento representativo de 4. *:p<0.02; **: p<0.01.

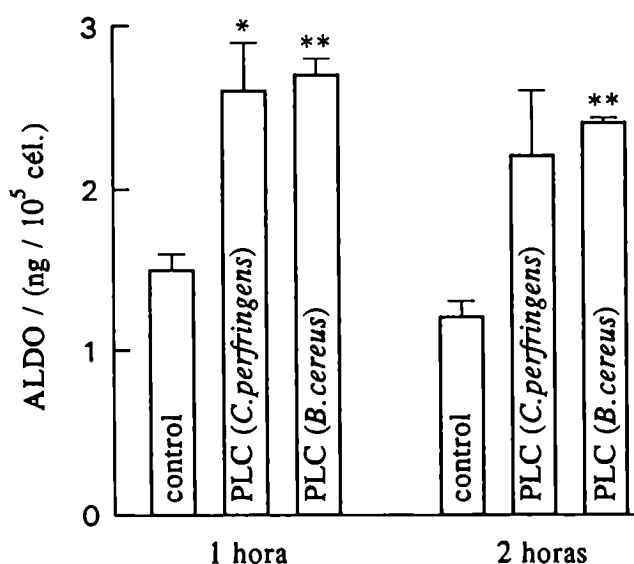


Figura 3.11: Producción de ALDO mediada por PLC

10^5 cél. se incubaron durante 1 y 2 hs. a 37°C con 1 U.I. de dos PLC diferentes (provenientes de *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*). Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo \bar{X} los $\text{ng}/10^5$ cél. Los datos corresponden a un experimento representativo realizado por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

acil-glicerol, aumentan la producción de ALDO [224].

A fin de corroborar que el incremento de DAG provoca una mayor biosíntesis de ALDO se realizaron incubaciones de células aisladas en presencia de PLC provenientes de dos fuentes diferentes: *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. La figura 3.11 muestra los resultados obtenidos a partir de incubaciones realizadas durante una y dos horas en presencia de 1 U.I. de sendas enzimas. El nivel basal de ALDO fue 1.50 ± 0.14 $\text{ng}/10^5$ cél.. Ambas PLC provocan un aumento significativo en el contenido del esteroide, siendo las relaciones tratado/control calculadas igual a 1.75 y 1.86 para la enzima de *Clostridium* y 1.83 y 2.1 para la enzima de *Bacillus*, para 1 y 2 horas de incubación, respectivamente.

Dado que la enzima proveniente de *Bacillus cereus* produjo un porcentaje de aumento ligeramente superior al provocado por la enzima de *Clostridium perfringens* se llevó a cabo una curva dosis respuesta utilizando la enzima más potente. La figura 3.12 muestra los resultados obtenidos a partir de cuatro experimentos realizados por duplicado que se

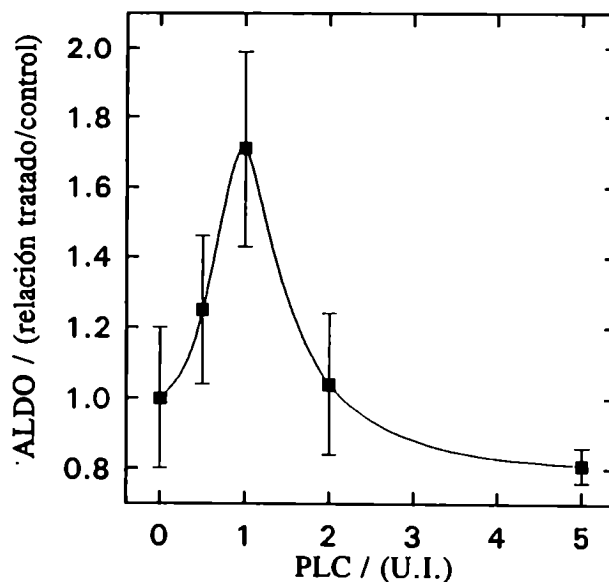


Figura 3.12: Curva de producción de ALDO vs concentración de PLC 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con diferentes concentraciones de PLC proveniente de *Bacillus cereus*. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de ALDO. Los datos corresponden a un promedio de 4 experimentos realizados por duplicado.

llevaron a cabo durante 90 minutos a 37°C . Los valores correspondientes al tratamiento control de los distintos experimentos fueron (0.55, 0.73, 1.52 y 1.50) ng de ALDO/ 10^5 cél. La curva construida corresponde al promedio de relaciones tratado/control calculadas a partir de cada ensayo. Como se observa, la misma presenta un máximo de producción de ALDO con PLC 1 U.I., siendo la relación tratado/control igual a 1.68; dosis mayores de PLC podrían estar provocando un daño celular inespecífico debido al exceso de hidrólisis de lípidos de membrana.

Hadjian *et al.* han reportado que PLC incrementa la producción de cortisol cuando se agrega a células de fasciculata bovina [259].

Por otro lado, se realizaron experimentos en presencia del inhibidor de la enzima DAG quinasa (R_{59022}) que incrementa el contenido de DAG formado, al impedir su transformación a ácido fosfatídico. La figura 3.13 muestra la curva correspondiente al incremento

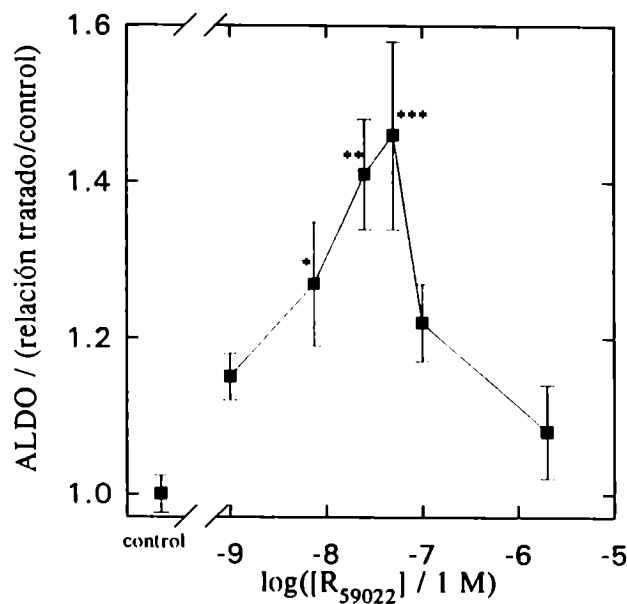


Figura 3.13: Curva de producción de ALDO vs concentración de R₅₉₀₂₂ 10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con diferentes concentraciones de R₅₉₀₂₂. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de ALDO. * p<0.05; ** p<0.02 y *** p<0.01 (ANOVA).

en la producción de ALDO vs la concentración de R₅₉₀₂₂. ALDO aumenta de manera dosis dependiente, siendo significativo el incremento con respecto al tratamiento control a partir de la concentración de R₅₉₀₂₂ 5 nM (relación tratado/control=1.17±0.08). El incremento de ALDO mediado por el inhibidor de la DAG quinasa alcanza un máximo con la concentración 50 nM siendo la relación tratado/control calculada 1.38±0.11.

De esta manera, mediante tres abordajes experimentales diferentes, que consistieron en incrementar el contenido de DAG intracelular se obtuvo un aumento en la producción de ALDO; estos resultados sugieren que alguna quinasa dependiente de DAG podría estar involucrada en el incremento del contenido del esteroide.

A fin de establecer alguna relación entre este efecto de DAG y la acción de bajas concentraciones de St sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH se llevaron a cabo experimentos estimulando células con DAG, PLC y R₅₉₀₂₂ en presencia o ausencia de una dosis baja de St.

En la tabla 3.6 se muestran las relaciones tratado/control calculadas a partir de experimentos realizados en forma independiente con los tres estimuladores DAG, PLC y R₅₉₀₂₂. Como se observa, la presencia de St 16 nM inhibe el efecto estimulador de la producción de ALDO provocado por un aumento en el contenido de DAG. El porcentaje de inhibición calculado con respecto a cada tratamiento realizado en ausencia de St fue 79%, 134% y 48% para DAG, PLC y R₅₉₀₂₂, respectivamente.

A partir de estos resultados se concluye que una quinasa activable por DAG es sensible a bajas concentraciones de St. De acuerdo con los antecedentes de bibliografía, la principal quinasa dependiente de DAG es la PKC ([90] y sus ref.). Así, comparando los resultados aquí presentados junto con los mostrados en la sección 3.2.1, se sugiere que PKC podría ser una de las quinasas distintas a PKA involucrada en la modulación de la respuesta esteroidogénica a ACTH.

Estudios realizados por algunos investigadores apoyan esta hipótesis demostrando que ACTH induce un incremento en el contenido de DAG y la traslocación de la PKC de citosol a membrana en cultivo de células de glomerulosa de ternero [161].

Tabla 3.6: Efecto de St sobre la producción de ALDO mediada por un aumento de DAG

Tratamiento	ALDO / (relación tratado/control)	
	—	St 16 nM
Control	1.00±0.02	0.95±0.08
DAG 100 µg/ml	1.45±0.24	1.04±0.23
PLC 1 U.I.	1.71±0.20	0.72±0.05
R ₅₉₀₂₂ 50 nM	1.46±0.12	1.18±0.05

10⁵ cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con DAG, PLC y R₅₉₀₂₂ en presencia o ausencia de St 16 nM. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de ALDO.

3.3.2 Efecto de PMA sobre la Producción de ALDO

Los experimentos con ésteres de forbol se realizaron con el objeto de medir la acción de ACTH en células con actividad de PKC depletada. Es bien sabido que PMA produce un incremento desregulado de la actividad de la enzima, así como una continua traslocación de la misma desde el citosol a la membrana plasmática, donde PKC es transformada a una

forma "M" que luego es degradada (ver capítulo 1). De esta manera, como consecuencia de este constante estímulo por PMA la célula se depleta de PKC dado que la mayor parte de la enzima se encuentra en la membrana y en alta proporción como la isoforma "M" o degradada [228,75,229,230,240,98].

Las condiciones de depleción se logran ya sea por tratamiento de las células con altas concentraciones de PMA y/o con incubaciones por tiempos prolongados (ver capítulo 2).

En la figura 3.14 se muestra la curva dosis respuesta de la producción de ALDO mediada por ACTH 10^{-9} M en función del pretratamiento de las células (durante 2 horas) con concentraciones crecientes de PMA. Como se observa, el pretratamiento con PMA provocó una inhibición dosis dependiente, de la producción de ALDO mediada por ACTH. Esa inhibición se hace significativa, a partir de la concentración de PMA 10 nM (45%). La mayor inhibición se logra en presencia de PMA 1 μ M (84%).

Estos resultados están de acuerdo con reportes de otros autores [75,162]. Cozza *et al.* mostraron que el pretratamiento con PMA reduce la estimulación de la producción de ALDO mediada por ACTH, en cultivos celulares de zona glomerulosa de ternero [75].

Este efecto inhibitorio de la producción de ALDO producido por pretratamiento de las células con PMA es similar al efecto inhibitorio observado en las incubaciones con St (ver figuras 3.5 y 3.7). Este resultado es una evidencia más, que sugiere que PKC sería al menos una de las quinasas involucradas en la respuesta aldosteronogénica a ACTH.

3.4 Discusión

La principal vía de transducción de la señal de ACTH es la que involucra la activación de la enzima adenililciclase y el consecuente aumento en la producción de cAMP. Sin embargo, han sido propuestos otros mecanismos que podrían participar de la acción de ACTH en células de glomerulosa y fasciculata [149,150,151,231]. Los sistemas de señales postulados son el flujo de Ca^{++} ([44,145,156,36,157,260,261,158,154] y sus referencias) y PKC ([161, 154] y sus ref.), habiéndose hallado sustratos tanto para las quinasas dependientes de Ca^{++} -calmodulina como para PKC en células de glomerulosa de rata [262].

En este trabajo se ha demostrado que el inhibidor de quinasas staurosporina [238,99] ha resultado ser una herramienta útil para discriminar entre el estímulo de la esteroidogénesis provocado por ACTH con el estímulo producido por diBu-cAMP. Además, los ensayos realizados con los péptidos ACTH₁₋₁₀ y ACTH₁₁₋₂₄ demuestran que la vía activada por ACTH₁₁₋₂₄ es más sensible a la acción de St que el camino estimulado por ACTH₁₋₁₀.

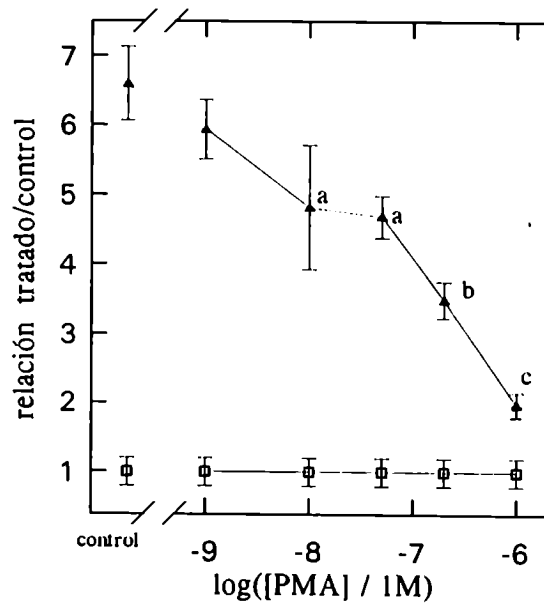


Figura 3.14: Efecto de PMA sobre la producción de ALDO

La preparación celular se preincubó durante 2 hs. a 37°C con diferentes concentraciones de PMA. Finalizada la preincubación las células se lavaron y se incubaron a razón de 10⁵ cél. por tubo con: (□) vehículo, y (▲): ACTH 10⁻⁹ M. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo \bar{X} las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de ALDO. a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$ y c: $p < 0.001$ (ANOVA).

Estos resultados, tomados en conjunto sugirieron la participación de un sistema de señal alternativo y/o modulador de la vía de la adenilil ciclasa.

La producción de ALDO en células de glomerulosa resultó estar ligeramente más afectada por la presencia de St que la producción de B en células de fasciculata, sugiriendo una mayor sensibilidad del citocromo responsable de la conversión $B \rightarrow ALDO$ a ser modulado por quinasas sensibles a St. Esta hipótesis es apoyada por los estudios realizados por Cozza *et al.*, quienes encontraron que la desensibilización de la respuesta a ACTH provocada por tratamientos prolongados con la hormona y por pretratamientos con ésteres de forbol afecta más la producción de ALDO que la de B [75].

Es bien sabido que cAMP estimula la producción de ALDO mediante la activación de PKA [144,145,146,147,36,148]. Los resultados aquí presentados muestran que la presencia de concentraciones altas de St ($> 1.6 \mu M$) inhibe totalmente la producción de ALDO mediada por diBu-cAMP o FK, sugiriendo que el inhibidor de quinasas a esta concentración está afectando la actividad de PKA. La posibilidad de que concentraciones altas de St estuvieran provocando algún efecto tóxico o inespecífico a las células queda descartada dado que la presencia de St no produjo ninguna disminución en el número de células viables determinadas por la técnica de exclusión con Trypan Blue. Además, la producción del cAMP mediada por ACTH, CT o FK no se ve afectada o está ligeramente incrementada en esas condiciones. El "por qué" de ese incremento no es muy claro pero una hipótesis podría ser que la actividad de la adenililciclase sea controlada también, por una retroalimentación negativa a través de PKA, así al inhibir la quinasa con St $1.6 \mu M$ aumenta la producción de cAMP.

Otra hipótesis alternativa es que St afecte a la fosfodiesterasa que transforma cAMP en $5'(\text{OH})\text{-AMP}$, a través de algún mecanismo indirecto que pudiese involucrar a PKA. Los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados con ACTH en presencia de St y MIX juntos apoyarían esta hipótesis, dado que el agregado de St $1.6 \mu M$ no incrementa el contenido de cAMP obtenido con ACTH + MIX.

Por otro lado, la presencia de concentraciones de St menores a 50 nM provoca inhibición de los niveles de ALDO y cAMP mediados por ACTH y CT y no los mediados por FK. Estos resultados sugieren que St estaría afectando la actividad de alguna quinasa diferente a PKA, involucrada en la regulación de algún punto de la cascada, ubicado entre la interacción de ACTH con su receptor y la activación de la adenililciclase.

La posibilidad de que St esté afectando la unión de ACTH a la célula queda descartada por estudios de unión de $[^{125}\text{I}]\text{-ACTH}$, realizados en el laboratorio. En la tabla 3.7 se

muestran los resultados obtenidos y se observa que la presencia de St 16 nM no afecta estadísticamente la unión de [125 I]-ACTH a su receptor.

Tabla 3.7: Efecto de St sobre la unión de [125 I]-ACTH

St / (nM)	unión de [125 I]-ACTH / (dpm)
0	17245±1543
16	16275±1764
1600	17892±1945

Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ de dos experimentos llevados a cabo por triplicado. Comunicación personal del Dr. E.N. Cózza

Bajas concentraciones de St también provocan la inhibición de la producción de ALDO y cAMP mediados por CT, así St podría estar afectando la actividad o el acople de alguna proteína G. De esta manera, la quinasa inhibible por concentraciones bajas de St podría estar involucrada en la activación de la Gs mediada por ACTH. Además, la actividad basal (no estimulada por ACTH) de esa quinasa sería suficiente para modular la acción de CT. Emoto *et al.* encontraron que el tratamiento con PMA de células de tiroide porcina modula positivamente la producción de cAMP mediada por TSH y CT, sugiriendo que el acople entre la proteína G, y la adenililciclase estaría favorecido por la fosforilación de alguna de esas proteínas [165]. Por otro lado, varios investigadores han reportado que tanto la subunidad α_i como la subunidad β libres son sustrato de varias quinasas, en particular de PKC [57,58,97,263]. Estudios de Langlois *et al.* realizados en cultivos de células adrenales bovinas mostraron que PMA potencia la producción de cAMP mediada por ACTH al inhibir la actividad de G, por fosforilación de la subunidad β [57]. Además, Katada *et al.* mostraron que la subunidad α_i es un buen sustrato de la PKC [97] y Birnbaumer *et al.* encontraron que el tratamiento con toxina de Pertussis mimifica el efecto de los ésteres de forbol sobre la generación de cAMP mediada por ACTH, sugiriendo que el blanco de la PKC sería la subunidad α_i libre [264].

Teniendo en cuenta estas hipótesis, los resultados aquí presentados apoyan fuertemente la idea de que ACTH activa una quinasa que modula positivamente la formación de cAMP, fosforilando alguna de las subunidades de la proteína G.

Resumiendo, de los estudios de las acciones dosis dependientes del inhibidor de quinasas —St— se desprende que el mismo afecta la esteroidogénesis mediada por ACTH

al menos en dos puntos: uno ubicado antes de la producción de cAMP (inhibible por concentraciones de St menores a 50 nM) y otro localizado después de la activación de la adenililciclase (inhibible solamente con concentraciones de St del orden de 1.6 μ M). Estos resultados, tomados juntos confirman que en el mecanismo de transducción de la señal de ACTH participan más de una quinasa.

De todos modos, por lo aquí descrito, la(s) otra(s) quinasa(s) diferentes a PKA estaría(n) modulando la vía ACTH \rightarrow G_s \rightarrow adenililciclase \rightarrow cAMP \rightarrow PKA, más que constituyendo una vía alternativa.

La posibilidad de que esa otra quinasa también constituya una vía alternativa está avalada por el hecho de que la acción estimuladora de ACTH₁₁₋₂₄, que no aumenta cAMP [155], es bloqueada casi totalmente por la presencia de St 16 nM. Además, es bien aceptado que bajas concentraciones de ACTH son capaces de estimular la secreción de ALDO sin modificar los niveles de cAMP y que los EC₅₀ determinados para la biosíntesis de ALDO y de cAMP mediadas por ACTH, son diferentes [44].

La identidad de esa otra quinasa es fuente de muchas controversias. Como ya se mencionó ha sido sugerida la participación de la quinasa dependiente de Ca⁺⁺-calmodulina, siendo el segundo mensajero, en este caso, el aumento de la [Ca⁺⁺]; y por otro lado, la participación de la PKC a través de un incremento en los niveles de DAG y Ca⁺⁺.

La participación de PKC en la estimulación de la aldosteronogénesis está indirectamente estudiada a través de los efectos del estimulador endógeno DAG. Los resultados mostraron que el aumento del contenido de DAG provocó un pequeño pero significativo aumento en la producción de ALDO; además esta acción de DAG o de los agentes que incrementan el contenido del mismo fue inhibido por la presencia de bajas dosis de St sugiriendo que una quinasa dependiente de DAG activaría la esteroidogénesis *per se*. Por otro lado, la misma concentración de St inhibe en un grado semejante la respuesta aldosteronogénica mediada por ACTH, aumentando la probabilidad que sea la misma quinasa, la estimulada por los dos agonistas.

Los estudios realizados con células con actividad de PKC depletada por pretratamiento con PMA también sugieren que PKC estaría involucrada en la producción de esteroides mediadas por ACTH, dado que el pretratamiento con el éster de forbol provoca disminución en la producción de ALDO mediada por el péptido, en forma similar a lo obtenido con concentraciones bajas de St. Cozza *et al.* también encontraron que el pretratamiento con PMA reduce la aldosteronogénesis mediada por ACTH, en cultivos de células de glomerulosa de ternero [75]. Sin embargo, estos resultados no han sido encontrados en su

totalidad, por otros investigadores [98,47]; la razón de esas diferencias no parece ser muy clara, pero podría deberse a la existencia de grandes diferencias experimentales.

Los resultados presentados aquí aportan evidencias de que la activación de PKC provoca un aumento en la producción de ALDO. La acción de PKC sería directa y/o a través de una modulación de la vía del cAMP.

La posibilidad de que otras quinasas, en particular aquellas dependiente del ión Ca^{++} , medien la respuesta adrenal a ACTH no se puede dejar de tener en cuenta. Es bien sabido que la biosíntesis de ALDO es dependiente de la concentración del Ca^{++} extracelular [145, 156,157]. Por otro lado, resultados propios obtenidos a partir de incubaciones realizadas con concentraciones creciente de Ca^{++} en el medio extracelular mostraron que la presencia de dicho ión aumenta la respuesta aldosteronogénica mediada por ACTH, FK y diBu-cAMP. En efecto, en medio libre de Ca^{++} ACTH 1 nM, FK 10 μM y diBu-cAMP 1 mM incrementan el contenido de ALDO 6.95, 8.70 y 7.65 veces, respectivamente. En presencia de una concentración de Ca^{++} 0.5 mM, el aumento en los niveles de ALDO provocado por dichos agentes fue 8.64, 9.69 y 9.73 para ACTH, FK y cAMP, respectivamente.

Si bien el rol preciso de Ca^{++} en mediar el efecto de ACTH es todavía materia de discusión [265,44,266], varios reportes propusieron una acción de dicho ión anterior a la activación de la adeniliclasa. Cheitlin *et al.* demostraron que el Ca^{++} es necesario para la unión de ACTH a su receptor [266] y Fakunding *et al.* propusieron que el mismo es necesario para la activación de la adeniliclasa [36].

Por otro lado, Kojima *et al.* han demostrado que ACTH provoca un influjo de Ca^{++} , el cual estaría acoplado con la activación de la adeniliclasa pero también actuaría es forma sinérgica con cAMP [44]. Resultados propios mostraron que la aldosteronogénesis mediada por ACTH es inhibida por la presencia de verapamil, que es un conocido bloqueante de canales de Ca^{++} del tipo L.

En la figura 3.15 se esquematiza el mecanismo de transducción de señal que se sugiere a partir de las observaciones realizadas en este trabajo. a) Existiría uno o más segundos mensajeros diferentes de cAMP en la transducción de la señal de ACTH, b) St inhibiría con diferente afinidad a algunas de las quinasas que participan en la producción de ALDO mediada por ACTH, c) la(s) quinasa(s) inhibibles con bajas dosis de St estarían involucrada(s) en la activación de Gs, d) El incremento de cAMP provocado por altas dosis de St podría deberse a que se haya inhibido la retroalimentación negativa que ejerce PKA sobre la adeniliclasa o bien a una inhibición de la fosfodiesterasa, probablemente como consecuencia de la inhibición de PKA, e) la activación de PKC incrementaría directamente la

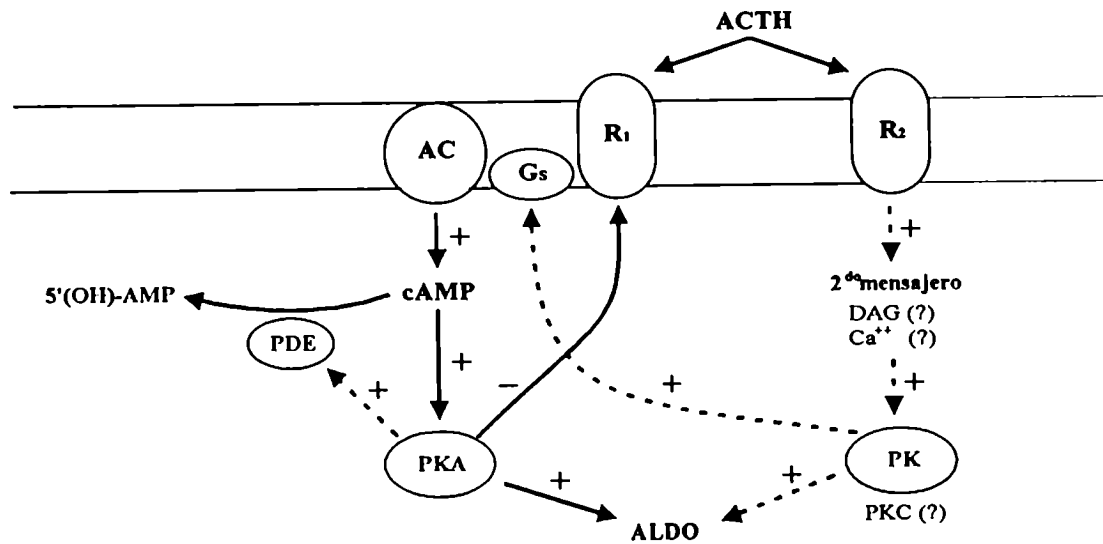
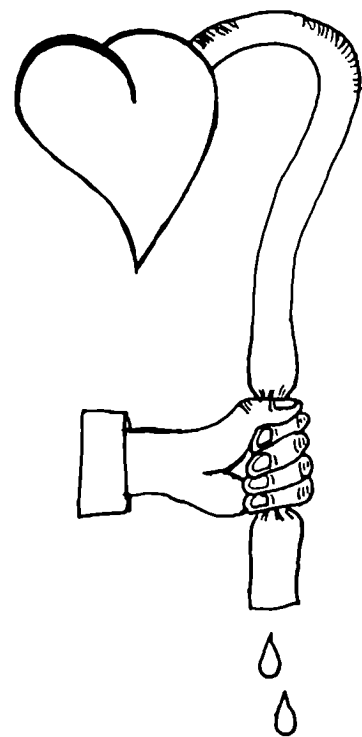


Figura 3.15: Esquema del posible mecanismo de acción de ACTH. (—) camino conocido; (...) camino propuesto.

esteroidogénesis y modularía positivamente la formación de cAMP, presentándose como un candidato posible en la mediación de la respuesta aldosteronogénica producida por ACTH.

Capítulo 4

Acción de Endotelina



En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir del estudio de los efectos del péptido ET-1, llevado a cabo mediante ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 2. Estos resultados se encuentran agrupados en dos secciones. La primera sección corresponde a los efectos vasculares de ET-1 sobre la presión arterial media como respuesta a su acción vasoconstrictora y sobre la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa, como moduladora de la contracción vascular. La segunda sección muestra los resultados correspondientes a los efectos de ET-1 sobre la respuesta adrenal; en particular se estudió la regulación de la actividad esteroidogénica de la glándula, los posibles mecanismos involucrados en dicha regulación y además, la acción que ET-1 pudiera ejercer sobre la aldosteronogénesis mediada por ACTH.

4.1 Efectos Vasculares de Endotelina

4.1.1 Vasoconstricción

ET fue descrita como el péptido más potente en contraer anillos de aorta pertenecientes a distintas especies y de inducir hipertensión en ratas anestesiadas [170]. La figura 4.1 (panel A) muestra las variaciones de la presión arterial media producidas al infundir ET-1 a ratas de la cepa Sprague Dawley (SD). Estos resultados indican que ET-1 provoca un ligero decremento en la presión arterial media, al cabo de 15 minutos de iniciada la administración de la misma; este decremento de 3% resultó ser significativo. Luego, la presión se incrementa a lo largo de la infusión con ET-1, alcanzando un valor de 20% de aumento con respecto al tratamiento control. Este efecto vasodilatador inicial y transiente, seguido por una vasoconstricción sostenida, provocado por la infusión de ET-1, también ha sido descrito por otros investigadores [171,170].

Los resultados arriba descriptos fueron observados, también, en las cepas SR y SS; a pesar que estos últimos animales, sensibles a la dieta de alto sodio (ver sección 2.1), presentaron la presión arterial media inicial levemente superior a la normal (86 ± 4 mmHg vs. 62 ± 5 mmHg para SR o 73 ± 4 para SD), aún bajo dieta normal de sal.

El hematocrito es un parámetro representativo de la situación de vasoconstricción dado que el aumento en la presión hidrostática intravascular aumenta la pérdida de agua por la pared de los vasos sanguíneos, incrementándose así la relación fase particulada/fase acuosa (plasma) de la sangre. Cuando el proceso de vasoconstricción es seguido por mecanismos compensadores (*e.g.* redistribución de los líquidos del organismo, aumento

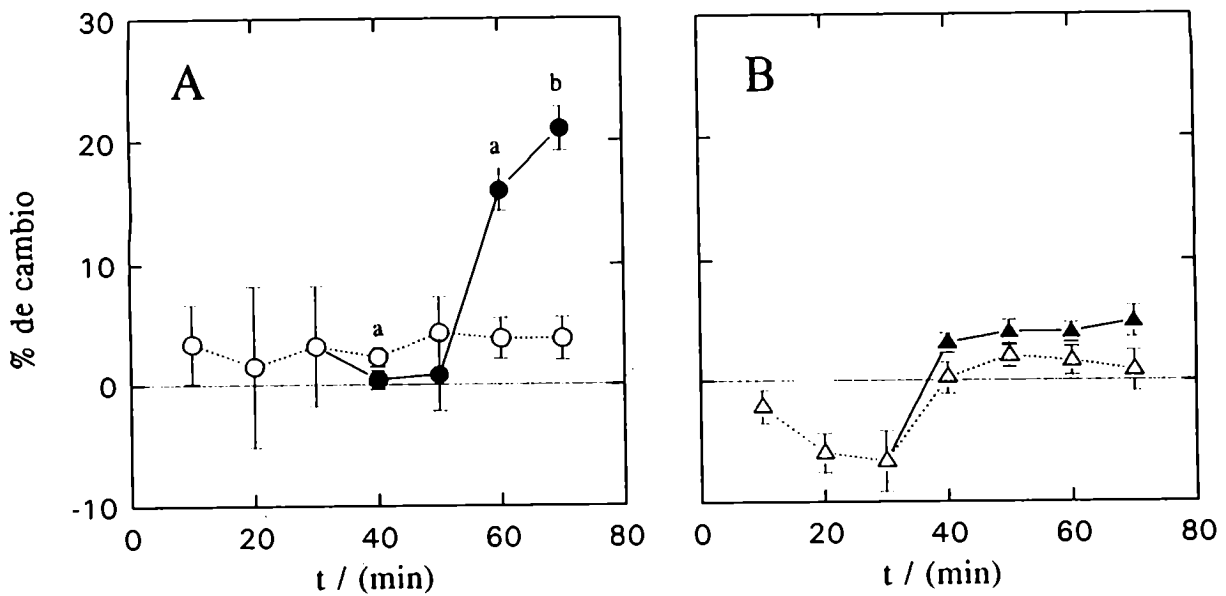


Figura 4.1: Efecto de ET-1 sobre la presión arterial media

La presión arterial media se registró a lo largo de la infusión de ET-1 en ausencia (panel A) o presencia (panel B) de BQ-123. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ obtenidos de 6 animales ensayados para cada condición, siendo X el % de cambio producido. ○: infusión de sol. fisiológica, △: infusión de BQ-123. Símbolos abiertos: sin ET-1 y símbolos cerrados: con ET-1. a: $p < 0.05$; b: $p < 0.02$.

de la concentración proteica extravascular, etc.), el aumento del hematocrito puede no evidenciarse.

En la tabla 4.1 se expresan las relaciones Hc_2/Hc_1 (ver sección 2.2.3), calculadas a partir de los hematocritos determinados antes (Hc_1) y después (Hc_2) de la infusión de ET-1, en función de la dosis suministrada. Estos datos se obtuvieron infundiendo cada dosis de ET-1 a tres flujos diferentes (e.g. 50, 125 y 180 $\mu\text{l}/\text{min.}$).

Tabla 4.1: Incremento del hematocrito por acción de ET-1

		Relaciones Hc_2/Hc_1					
		Flujos de infusión / ($\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$)					
			50		125		180
Dosis de ET-1 ($\text{ng}.\text{Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	0	0.96 ± 0.04	(4)	0.90 ± 0.04	(6)	0.81 ± 0.13	(3)
	20	0.97 ± 0.04	(3)	0.95 ± 0.06	(3)	ND	
	50	0.98 ± 0.03	(2)	1.02 ± 0.08	(3)	1.23 ± 0.19	(2)
	80	1.10 ± 0.20	(2)	1.12 ± 0.06	(5)*	1.26 ± 0.13	(2)*
	110	1.13 ± 0.11	(2)	1.27 ± 0.13	(3)*	1.36 ± 0.10	(2)**

Las ratas fueron infundidas con ET-1 a las dosis y flujos indicados. Se determinaron: Hc_1 y Hc_2 , a los 30 min. y a los 75 min. de infusión respectivamente. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{ES}$, siendo X las relaciones Hc_2/Hc_1 . Los valores entre paréntesis corresponden al número de animales utilizados. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.02$ (ANOVA). ND: no determinado.

Como es de esperar, el incremento del flujo de infusión en ratas control provocó una disminución del hematocrito. Los valores de Hc_1 determinados para los tres flujos de infusión ensayados fueron 47.9 ± 1.9 ($n = 13$), 46.7 ± 0.7 ($n = 33$) y 42.9 ± 1.17 ($n = 17$), para 50, 125 y 180 $\mu\text{l}/\text{min.}$, respectivamente. El Hc_1 determinado a flujo 180 $\mu\text{l}/\text{min.}$ presenta diferencia significativa con respecto al calculado para el flujo 50 $\mu\text{l}/\text{min.}$ Las relaciones Hc_2/Hc_1 calculadas para los tres tratamientos control, no presentan diferencias significativas: 0.96 ± 0.04 , 0.90 ± 0.04 y 0.81 ± 0.13 para 50, 125 y 180 $\mu\text{l}/\text{min.}$, respectivamente.

Por otro lado la tabla 4.1 también muestra que ET-1 produce un aumento en el hematocrito de manera dosis-dependiente, haciéndose este incremento más notable a medida que aumenta el flujo de infusión, probablemente por el menor valor del Hc control. Así, los efectos máximos obtenidos son del 13%, 27% y 36% para 50, 125 y 180 $\mu\text{l}/\text{min.}$ respectivamente. El aumento de Hc mediado por ET-1 fue observado también por otros investigadores; Badr *et al.* [267] sugirieron que dicho aumento podría ser debido a una

pérdida de volumen plasmático. Sin embargo, el incremento del Hc no está asociado en forma proporcional a un incremento de proteínas plasmáticas (comunicación personal Dr. C.E. Gómez-Sánchez), sugiriéndose así un pasaje de proteínas al intersticio durante la infusión de ET. El pasaje de albúmina ya ha sido demostrado en corazón, músculo esquelético e intestino [216].

Por otro lado, ET-1 provocó una drástica disminución del volumen urinario. En efecto, las relaciones VU_2/VU_1 calculadas a partir de la medición del volumen de orina colectada durante los últimos 15 minutos de cada una de las dos etapas de infusión (ver esquema de infusión en la figura 2.1) fueron 3.1 ± 0.8 para el tratamiento control y 0.4 ± 0.1 para el tratamiento con $80 \text{ ng ET-1} \cdot (\text{Kg. de peso corporal})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a un flujo de $125 \mu\text{l}/\text{min}$. El decremento del volumen urinario posterior a la infusión de ET ha sido también reportado por Miller *et al.*, quienes sugirieron que este efecto podría ser causado por una disminución del flujo sanguíneo renal provocada por la vasoconstricción mediada por ET [268].

Subpoblación de receptores a ET-1 involucradas en el efecto vasoconstrictor:

Como se detalla en el capítulo 1, ya han sido descritas al menos dos subpoblaciones de receptores a ET: los receptores ET_A que presentan alta afinidad por ET-1 y ET-2 y baja afinidad por ET-3 y Sarafotoxina [195] y, los receptores ET_B que presentan alta afinidad por todas las ETs y por Sarafotoxina [194].

Ihara y col. [201] han sintetizado un pentapéptido cíclico, Ciclo(-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp-), comercialmente denominado BQ-123, el cual es un potente antagonista de los receptores ET_A . El uso de BQ-123 permitió proponer la subpoblación de receptores que podría estar involucrada en los diferentes efectos de ET-1. Las figuras 4.1 (panel B) y 4.2 muestran que, cuando se coinfectan ET-1 y BQ-123, el incremento de la presión arterial media provocado por la infusión de ET-1 disminuye un 91%, con respecto al tratamiento con ET-1 solamente. Este bloqueo se observa desde el comienzo de la infusión con ET-1 (figura 4.1B) y se mantiene a lo largo de la misma (figura 4.2). La infusión de BQ-123, sólo, no produce variación alguna en la presión arterial media.

Por otro lado Hirata *et al.* [269] sugirieron que las células de músculo liso vascular expresan, predominantemente, receptores ET_A . Además, no ha sido encontrado mRNA de receptores ET_B en el sistema muscular vascular [195]. Los resultados arriba descritos sugieren entonces, que el efecto vasoconstrictor de ET sería mediado principal o exclusivamente por los receptores ET_A .

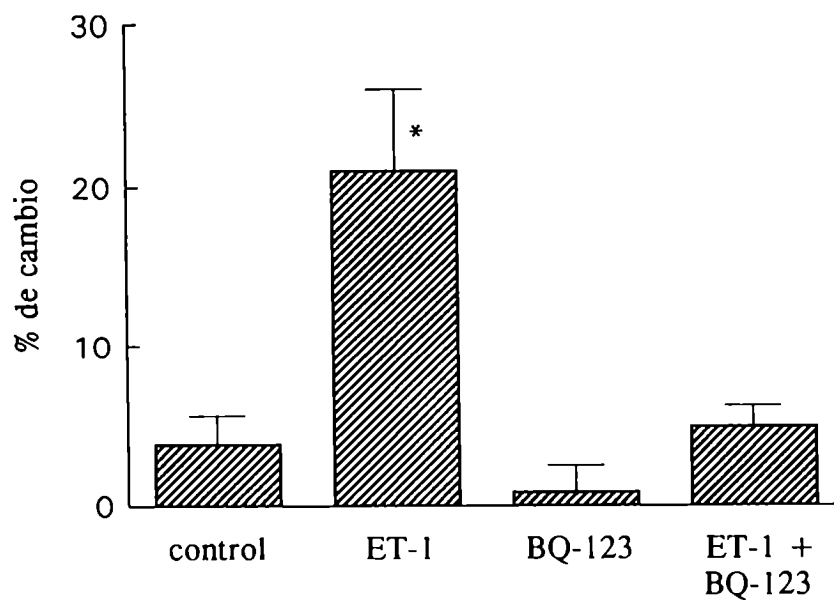


Figura 4.2: Efecto de BQ-123 sobre el incremento de presión arterial inducido por ET-1. Ratas SD se infundieron con ET-1, BQ-123 ó BQ-123 + ET-1. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ obtenidos de 6 animales ensayados para cada condición, siendo X el % de cambio producido a cabo de 45 minutos de infusión. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

4.1.2 Actividad de Na^+/K^+ -ATPasa en Aorta

Con el objeto de estudiar si ET-1 presenta alguna acción sobre la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa vascular, se realizaron ensayos que consistieron en medir dicha actividad en homogenatos de aortas provenientes de animales tratados con ese péptido.

Los resultados, expresados en la Tabla 4.2, muestran que la infusión de ET-1 a ratas SD produce un incremento del 88% en la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ . Este incremento no es bloqueado por la presencia del antagonista de receptores ET_A , BQ-123, sugiriendo que la activación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, mediada por ET-1, podría ser a través de los receptores ET_B , presentes en las células del endotelio vascular [270].

Varios reportes han mostrado que los péptidos movilizados de Ca^{++} activan a la enzima Na^+/K^+ -ATPasa en diferentes tejidos y en particular en músculo liso vascular [271,272]. Dado que ET estimula el contenido de Ca^{++} citosólico en células de ese tejido (ver [166] y sus ref.), los resultados aquí presentados son congruentes con esas observaciones.

Gupta *et al.* demostraron, mediante análisis de flujos de $^{86}\text{Rb}^+$, que ET estimula tanto la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa sensible a ouabaína como la actividad de ATPasas ouabaína-insensibles [273].

Sin embargo, ha sido reportado que una disminución en la concentración de potasio intracelular, debido a una inhibición de la bomba, también incrementa los niveles de calcio citosólico produciéndose en consecuencia una mayor vasoconstricción [274,275,110].

De acuerdo con estas últimas observaciones, la acción vasoconstrictora de ET-1 sería incompatible con una activación de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa. Es lógico, entonces, suponer que el efecto vasoconstrictor podría ser independiente del aumento en la actividad de la bomba; de hecho, ambas acciones de ET son básicamente mediadas por receptores diferentes, o sea, el efecto vasoconstrictor estaría asociado a los receptores ET_A y la activación de la enzima sería a través de los receptores ET_B .

Clozel *et al.* [270] demostraron que el efecto vasodilatador transiente se produce a través de la interacción de ET con los receptores ET_B presentes en el endotelio vascular. De acuerdo con esta observación, los resultados aquí presentados sugieren que la activación de la bomba estaría relacionada con el efecto vasodilatador de ET y sería a nivel endotelial.

Tabla 4.2: Efecto de ET-1 sobre la actividad en Na⁺-K⁺-ATPasa de aorta

Tratamiento	Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa / (pmol PO ₄ ³⁻ /μg prot.)
Control	180±12
ET-1	340±23*
BQ-123	172±12
BQ-123 + ET-1	327±11**

La actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa se determinó en homogenatos de la arteria aorta provenientes de animales tratados en las condiciones descritas. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm ES$ de tres experimentos realizados por duplicado. *: p<0.01 con respecto al tratamiento control, **: p<0.001 con respecto al tratamiento control y con BQ-123 (ANOVA).

4.2 Efecto de ET-1 sobre la Respuesta Adrenal

4.2.1 Presencia de Receptores a ET en Zona Glomerulosa

Estudios de localización por autorradiografía, utilizando [¹²⁵I]-ET-1 [188,187] han propuesto la existencia de receptores específicos a ET en glándula adrenal de rata. A fin de corroborar esa hipótesis se llevaron a cabo experimentos de unión utilizando ligandos iodados. Los resultados que se presentan en la figura 4.3 corresponden a curvas de desplazamiento obtenidas a partir de ensayos realizados incubando células de glomerulosa con [¹²⁵I]-ET-1 (panel A) o con [¹²⁵I]-S₆b (panel B), en presencia de concentraciones crecientes de ET-1 o S₆b o BQ-123, radioinertes.

En el panel A se observa que mientras ET-1 radioinerte desplaza totalmente a su homólogo radioactivo, BQ-123 y S₆b no logran desplazar toda la radioactividad asociada a las células. Este resultado sugiere que ET-1 comparte los sitios de unión específica con BQ-123 y con S₆b. La suma de los máximos porcentajes de desplazamiento, obtenidos a partir de incubaciones con cada uno de estos dos últimos agentes por separado (31% con S₆b y 75% con BQ-123), es equivalente al máximo porcentaje de desplazamiento logrado con ET-1 solamente (98%). En el panel B se observa que BQ-123 no desplaza la unión de [¹²⁵I]-S₆b, sugiriéndose así que ambos péptidos se unen a poblaciones de receptores mutuamente excluyentes. Por otro lado, ET-1 desplaza totalmente a [¹²⁵I]-S₆b, sugiriendo que la subpoblación de receptores que unen S₆b quedan incluidos dentro de la población

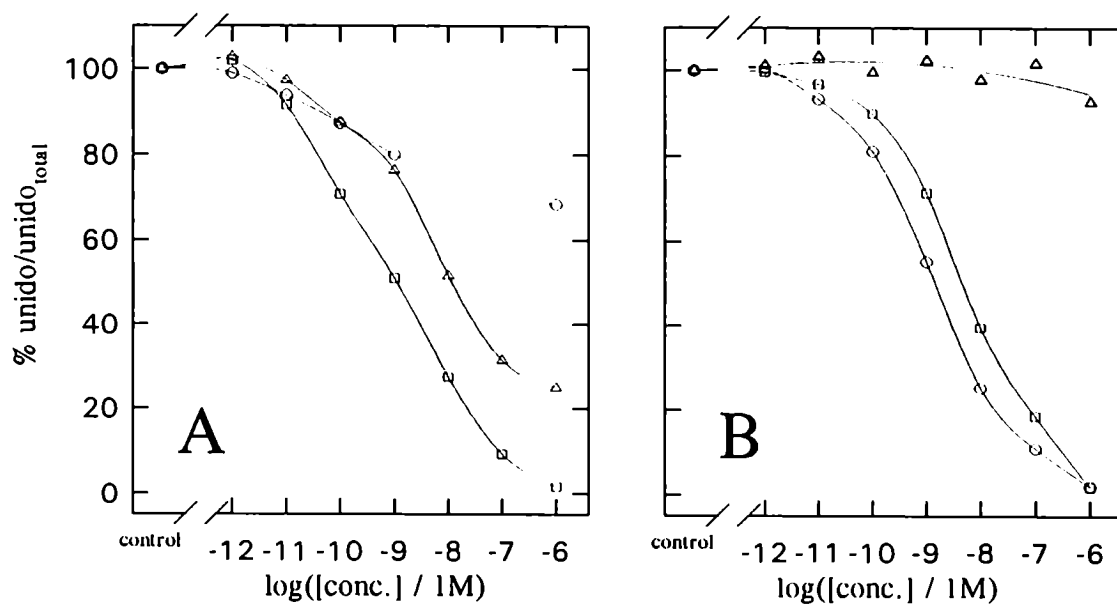


Figura 4.3: Unión de ET a las células de glomerulosa
 10^5 células se incubaron con $[^{125}\text{I}]\text{-ET-1}$ (panel A) y con $[^{125}\text{I}]\text{-S}_6\text{b}$ (panel B) en presencia de concentraciones crecientes de: □: ET-1, ○: S₆b y △: BQ-123 radioinertes.

de receptores que unen ET-1.

Los resultados aquí presentados demuestran la presencia de receptores específicos a ET en zona glomerulosa de adrenal de rata y sugieren que en este sistema coexisten al menos dos subpoblaciones, los receptores ET_A que unen BQ-123 y los receptores ET_B que unen S_6b . La abundancia relativa de cada subpoblación, calculada a partir de curvas de desplazamiento, corresponden a una presencia mayoritaria de receptores ET_A , 75% vs. 25% de receptores ET_B .

Por otro lado, se han descrito dos subtipos de receptores a ET en zona glomerulosa de ternero [191] y estudios realizados en adrenal de rata, han reportado una mayor proporción de receptores ET_A [192].

4.2.2 Acción Esteroidogénica de ET-1

En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir de estudios realizados con células de glomerulosa en suspensión y con animales enteros mediante infusiones de ET-1. Como respuesta esteroidogénica de la glándula adrenal se determinaron los niveles de ALDO, B y en algunos casos P_5 .

Primeramente se realizaron ensayos con células de glomerulosa en suspensión, con el objeto de determinar si el tiempo de incubación y la concentración de ET-1 utilizada influyen sobre la producción de esteroides.

La figura 4.4 (panel izquierdo) muestra la curva correspondiente a los niveles de ALDO producidos al incubar células con ET-1 10^{-8} M durante diferentes tiempos. El trazado de esta curva permite observar que la producción de ALDO es estimulada por la presencia de ET-1, siendo significativa la diferencia con respecto al tratamiento control, a partir de los 90 minutos de incubación con esa concentración de ET-1 ensayada.

Por otro lado, en el panel derecho se muestra la curva de biosíntesis de ALDO en función de la concentración de ET-1, trazada a partir de valores obtenidos al incubar células durante 90 minutos, en presencia de concentraciones de ET-1 que abarcaron un rango entre 10^{-11} M y 10^{-8} M. Los resultados presentados indican que el nivel de ALDO, producido por las células de glomerulosa, es dependiente de la concentración de ET-1 utilizada, alcanzándose una respuesta máxima en presencia de ET-1 10^{-9} M. Es de hacer notar que la disminución en la producción de ALDO, obtenida con ET-1 10^{-8} M, ha sido descrita también por otros autores [191] y tentativamente explicada como debida a una desensibilización mediada por las altas concentraciones de la hormona.

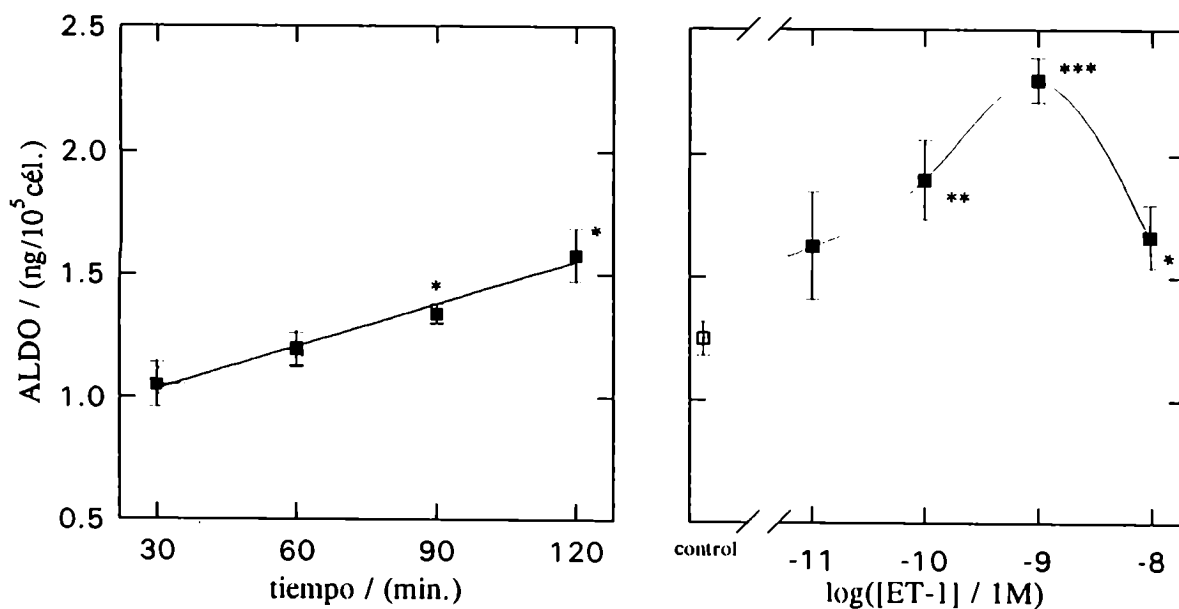


Figura 4.4: Producción de ALDO mediada por ET-1

10⁵ cél. se incubaron a 37°C. Panel izquierdo: en presencia de ET-1 10⁻⁸ M durante diferentes tiempos. Panel derecho: en presencia de concentraciones crecientes de ET-1 durante 90 minutos. *: p<0.05; **: p<0.02 y ***: p<0.001, con respecto al control.

La secreción de ALDO mediada por ET también ha sido descripta en otras especies, *e.g.* en ternero [191], en conejo [276], en humano [277] y también en rata [278,277,279,280].

La comparación de la respuesta adrenal a ET-1 con respecto a la respuesta a otros estimuladores, *e.g.* ACTH, A II y K^+ , dio como resultado que la esteroidogénesis mediada por ET-1 es significativamente menor que la respuesta mediada por los otros agentes. Los datos presentados en la figura 4.5 (panel superior) muestran que mientras ACTH 10^{-10} M estimula 6.3 veces la biosíntesis de ALDO, A II 10^{-8} M, 5.6 veces y K^+ 20 mM, 4.8 veces; ET-1 10^{-9} M sólo lo hace 2.1 veces, con respecto al tratamiento control.

Esta baja estimulación, fue también reportada por otros investigadores [191,277,280] y en estudios realizados con cultivos celulares, se observó que el grado de estimulación de ET es dependiente del suero utilizado en el medio de cultivo [193,281].

El análisis de la liberación de B de células de glomerulosa, permite observar (figura 4.5, panel inferior) que ET-1 no produce incremento en la secreción de este esteroide.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados *in vivo* apoyan las observaciones de los ensayos *in vitro*. La tabla 4.3 presenta las relaciones tratado/control, calculadas a partir de las determinaciones de ALDO citosólica adrenal luego de las infusiones. Estos resultados corresponden a 24 experimentos llevados a cabo con diferentes dosis de ET-1 y a tres flujos distintos (50, 125 y 180 μ l/min.). Los niveles de ALDO determinados para los tratamientos control correspondientes a cada uno de los flujos ensayados fueron (37.4 ± 2.6 , 29.1 ± 2.0 y 25.0 ± 4.1) ng ALDO/adrenal para 50, 125 y 180 μ l/min., respectivamente.

ET-1 provocó un aumento en el contenido de ALDO citosólica (tabla 4.3). La función dosis de ET-1 vs respuesta adrenal resultó ser bifásica, presentando un máximo entre 50 y 80 ng ET-1.(Kg. de peso corporal) $^{-1}$.min $^{-1}$, independientemente del flujo de infusión utilizado. Las estimulaciones máximas observadas fueron de 120%, 100% y 140% para 50, 125 y 180 μ l/min., respectivamente.

ET-1 también provocó un aumento significativo en los niveles de ALDO plasmática. En efecto, cuando el flujo de infusión fue 180 μ l/min., la dosis de 80 ng ET-1.(Kg de peso corporal) $^{-1}$.min $^{-1}$ incrementó ALDO plasmática de 24.4 ± 2.8 ng/dl (control) a 58.2 ± 4.3 ng/dl (tratado) ($p < 0.05$), siendo la relación tratado/control = 1.7. De la misma manera, en infusiones realizadas a flujo 125 μ l/min, 110 ng ET-1.(Kg de peso corporal) $^{-1}$.min $^{-1}$ incrementó la concentración de ALDO plasmática de 31.1 ± 0.7 ng/dl a 42.5 ± 1.8 ng/dl ($p < 0.05$) resultando una relación tratado/control = 1.4.

Estos resultados sugieren que el aumento en el contenido de ALDO citosólica (ver la

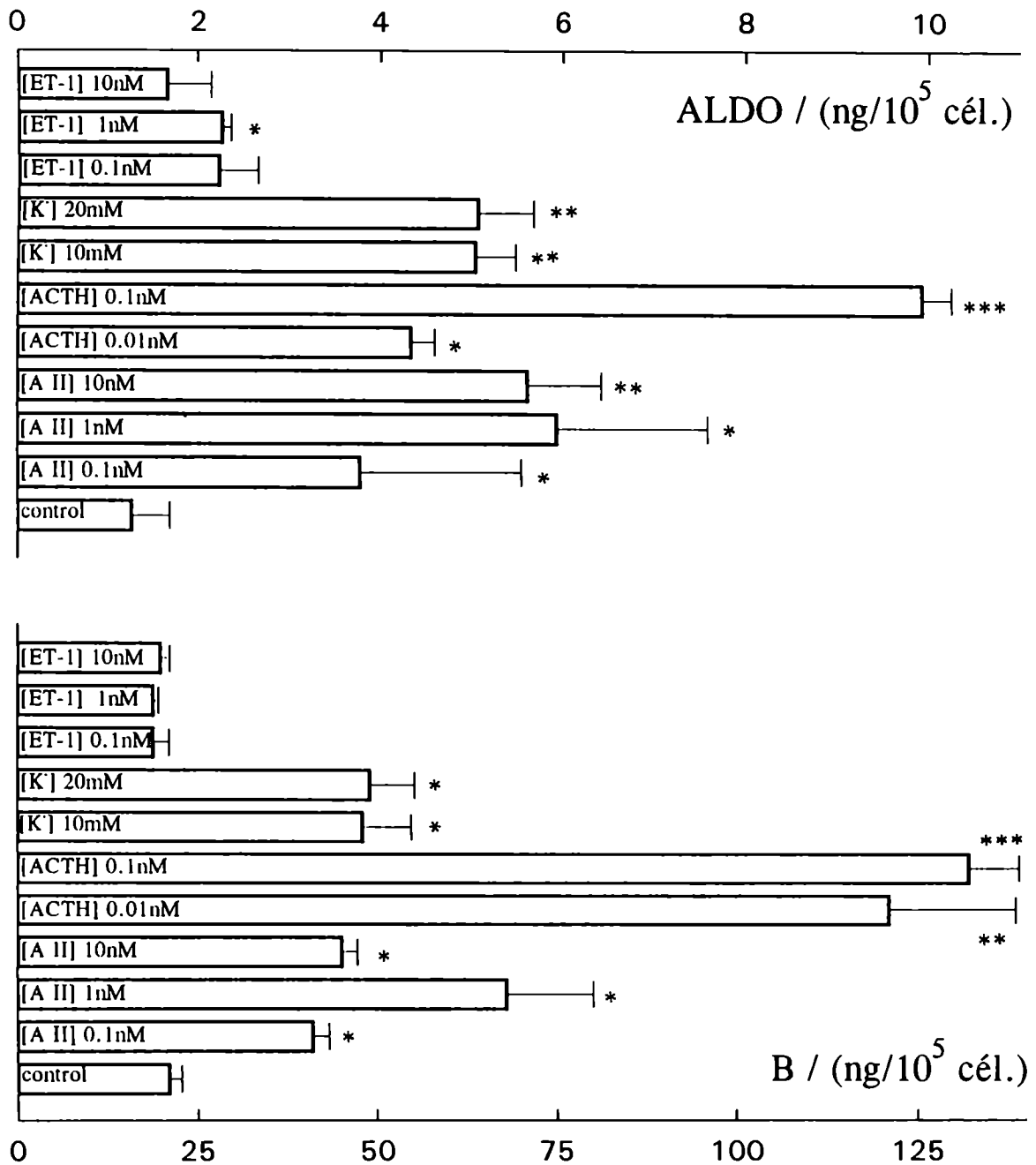


Figura 4.5: Comparación de actividades estimulantes

10⁵ cél. de zona glomerulosa adrenal se incubaron durante 90 min. a 37°C en presencia de ET-1, ACTH, A II y K⁺ en las concentraciones indicadas en la figura. Luego se determinó la producción de esteroides, panel superior: ALDO y panel inferior: B. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm ES$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de 2 experimentos realizados por duplicado. *: p<0.05; **: p<0.02; ***: p<0.001.

Tabla 4.3: Efecto de ET-1 sobre el contenido citosólico de ALDO

		Relaciones tratado/control					
		Flujos de infusión / ($\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$)					
		50	125	180			
Dosis de ET-1 ($\text{ng}.\text{Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	0	1.00±0.06 (8)	1.00±0.04 (13)	1.00±0.06 (8)			
	20	1.06±0.09 (4)	0.90±0.11 (6)	ND			
	50	1.13±0.07 (4)	1.26±0.20 (4)	2.43±0.22 (8)*			
	80	2.20±0.13 (4)*	1.91±0.14 (7)***	2.43±0.29 (7)**			
	110	1.31±0.05 (4)*	1.43±0.19 (6)*	1.86±0.06 (4)*			

Los animales se infundieron con ET-1 a dosis y flujos indicados durante 45 minutos. Luego se extrajeron las glándulas adrenales y se determinó el contenido citosólico de ALDO presente en las cápsulas. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control. Los valores entre paréntesis corresponden al número de animales utilizados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (ANOVA). ND: no determinado.

tabla 4.3) podría deberse a una estimulación de la biosíntesis de ALDO y no a una inhibición de la secreción del esteroide, dado que de estar inhibida la secreción, la concentración de ALDO plasmática no debería haber aumentado como consecuencia del tratamiento con ET-1.

A fin de estudiar la posible estimulación de la esteroidogénesis por ET-1, se realizaron ensayos de medición de la actividad enzimática de algunos citocromos mitocondriales involucrados en la producción de ALDO tales como el citocromo P-450_{5CC} y el citocromo P-450 (11 β ,18)-hidroxilasa/aldosintetasa (citocromo P-450_{11 β}). La tabla 4.4 presenta los resultados correspondientes a la determinación de la actividad enzimática de los citocromos P-450_{11 β} . Para ello, aproximadamente 0.8 mg de proteínas mitocondriales de adrenales provenientes de animales tratados según las condiciones de infusión que se detallan en la tabla, se incubaron con una concentración saturante de DOC (30 μM) (ver sección 2.2.7).

La síntesis basal de ALDO determinada para los 3 flujos de infusión no varió significativamente, siendo los valores medidos (0.45±0.03, 0.42±0.06 y 0.50±0.11) $\text{pg}/\mu\text{g}$ prot. para 50, 125 y 180 $\mu\text{l}/\text{min}.$, respectivamente. La relación dosis de ET-1 vs respuesta adrenal también resultó ser bifásica, presentando el máximo entre 50 y 80 ng

Tabla 4.4: Actividad del citocromo P-450 (11 β ,18)-hidroxilasa/aldosintetasa a partir de DOC

		Relaciones tratado/control					
		Flujos de infusión / ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)					
		50		125		180	
	0	1.00 \pm 0.07	(8)	1.00 \pm 0.05	(9)	1.00 \pm 0.04	(6)
Dosis de	20	1.78 \pm 0.35	(6)	0.98 \pm 0.05	(6)	ND	
ET-1	50	1.61 \pm 0.16	(4)*	2.53 \pm 0.26	(4)*	2.98 \pm 0.23	(8)**
(ng.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	80	1.80 \pm 0.24	(4)	1.51 \pm 0.10	(6)**	1.71 \pm 0.16	(8)**
	110	1.48 \pm 0.24	(4)	1.59 \pm 0.16	(6)**	1.14 \pm 0.03	(4)

Los animales se infundieron con ET-1 a dosis y flujos indicados durante 45 minutos. Luego se ensayó biosíntesis de ALDO en la fracción mitocondrial en presencia de 30 μM de DOC (ver detalles en el capítulo 2). Los valores entre paréntesis corresponden al número de animales utilizados. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ (ANOVA). ND: no determinado.

ET-1.(Kg. de peso corporal)⁻¹.min⁻¹; las estimulaciones máximas obtenidas correspondieron a 80% (flujo = 50 $\mu\text{l}/\text{min}$), 150% (flujo = 125 $\mu\text{l}/\text{min}$) y 200% (flujo = 180 $\mu\text{l}/\text{min}$). El incremento de la V_{max} aparente, de la conversión DOC en ALDO, indica que ET-1 estaría ejerciendo su efecto estimulador sobre el último paso o paso tardío ("late pathway") regulable de la biosíntesis de ALDO.

Por otro lado, se determinó la actividad del citocromo P-450_{SCC} de acuerdo con lo descrito por Kramer *et al.* [219]. Los resultados mostraron que 50 ng ET-1.(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ provoca un incremento en los niveles de P_s igual a 185%, cuando ET-1 se suministró con un flujo de 125 $\mu\text{l}/\text{min}$, (7.15 pg/ μg prot. para el tratamiento control y 20.4 pg/ μg prot. para el tratado con ET-1). Este resultado sugiere que ET-1 estimula, también, el paso temprano de la biosíntesis de esteroides.

Resumiendo, de acuerdo con los datos obtenidos a partir de los estudios *in vivo*, ET-1 produce un aumento en el contenido de ALDO citosólica. Este incremento podría ser consecuencia de una mayor actividad de las enzimas esteroideogénicas involucradas tanto en el paso temprano como en el paso tardío de la producción de esteroides ya que, comparando las tablas 4.3 y 4.4, se observa una buena correlación entre la activación de la conversión DOC en ALDO y el contenido citosólico de este esteroide. En efecto, ambos presentan un máximo alrededor de 50-80 ng ET-1.(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ independientemente

del flujo de infusión utilizado.

Por otro lado, la posibilidad de que el aumento de ALDO citosólica mediado por ET-1 pudiera deberse a una inhibición de la secreción del esteroide, quedaría descartada por el incremento de ALDO plasmática observado en los ensayos realizados, siendo los porcentajes de aumento de ALDO obtenidos en plasma, similares a los porcentajes de incremento en la conversión DOC en ALDO (e.g. $70\pm 6\%$ y $71\pm 7\%$, respectivamente para la condición ET-1 $80 \text{ ng.}(\text{Kg de peso corporal})^{-1}.\text{min}^{-1}$. y $40\pm 2\%$ y $59\pm 6\%$, respectivamente para ET-1 $110 \text{ ng.}(\text{Kg de peso corporal})^{-1}.\text{min}^{-1}$., ambos a flujo = $125 \mu\text{l}/\text{min}$).

De esta manera, la determinación de ALDO citosólica es un parámetro representativo de la actividad de las enzimas esteroidogénicas y además, del nivel de aldosterona circulante. En los ensayos subsiguientes se determinó este parámetro como variable de la respuesta adrenal a la acción de ET-1 *in vivo*.

A diferencia del efecto esteroidogénico de ACTH, que estimula tanto la síntesis como la liberación de los esteroides de la glándula adrenal [147,282,283], ET-1 estimularía sólo la producción de ALDO, sin modificar su secreción.

La acción esteroidogénica de ET-1 también fue reportada por otros investigadores; infusiones llevadas a cabo en perros [284,180] y en ratas [278,279] mostraron un aumento tanto en el contenido de ALDO plasmática como en la actividad renina-angiotensina [284, 212], sugiriendo que ET-1 podría actuar, no en forma directa sino a través de la activación del sistema renina-angiotensina plasmático.

A fin de considerar esta posibilidad, se realizaron infusiones con ET-1, en presencia o ausencia de Enalapril, que es un conocido inhibidor de la enzima convertidora de A I en A II. La tabla 4.5 presenta los resultados obtenidos en estos ensayos; se observa que Enalapril co-administrado en una dosis que inhibe la estimulación en la producción de ALDO mediada por A I, no afecta el incremento de ALDO citosólica provocado por ET-1, ni la activación de las enzimas involucradas en la conversión de DOC en ALDO. Además, Enalapril no produce variación en el contenido basal de esteroide.

Estos resultados indican que el efecto esteroidogénico de ET-1 sería independiente de la activación del sistema renina-angiotensina plasmático. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que ET-1 actúe a través del incremento en el contenido de A II intraadrenal.

En concordancia con estos resultados, Cao y Banks [212] observaron que la co-administración de Captopril (otro inhibidor de la enzima convertidora de A I en A II) no modifica el incremento en el contenido de ALDO plasmática provocado por ET-1.

Tabla 4.5: Efecto de Enalapril sobre el incremento de ALDO mediado por ET-1

Tratamiento	ALDO citosólico (ng/cápsula)	Actividad del citocromo P-450 _{11β} (pg/μg de prot.)
Control	30.1±0.1	0.50±0.02
Enalapril	25.3±5.6	0.49±0.01
A I	39.3±2.9 ^a	N.D.
Enalapril + A I	19.7±4.4 ^b	N.D.
A II	51.6±0.5 ^c	N.D.
ET-1	56.3±4.6 ^d	0.81±0.01 ^f
Enalapril + ET-1	65.8±7.4 ^e	1.00±0.01 ^g

Los animales se infundieron de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. A I se infundió a 300 ng.(Kg.min)⁻¹, A II a 40 ng.(Kg.min)⁻¹ y ET-1 a 80 ng.(Kg.min)⁻¹. Se determinó el contenido citosólico de ALDO y la capacidad de la fracción mitocondrial de convertir DOC en ALDO. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ de 2 experimentos realizados por duplicado, siendo X masa de ALDO. a:p<0.05 con respecto al control; b:p<0.05 con respecto a Enalapril; c:p<0.001 con respecto al control; d:p<0.02 con respecto al control; e:p<0.05 con respecto al control y a Enalapril; f:p<0.001 con respecto al control y g:p<0.001 con respecto al control y a Enalapril.

Finalmente, los experimentos con células aisladas (*in vitro*) más los resultados *in vivo* sugieren una acción directa de ET-1 sobre la glándula adrenal. Dicha acción sería principalmente la de incrementar la biosíntesis de ALDO.

Receptores de ET involucrados en la acción esteroidogénica: A fin de estudiar cuál de las dos subpoblaciones de receptores a ET, descritas en la zona glomerulosa adrenal, media el efecto esteroidogénico, se realizaron infusiones administrando, por un lado, el antagonista de los receptores ET_A, BQ-123 junto con ET-1 y por el otro, el agonista de receptores ET_B, S₆b. La figura 4.6 (panel A) muestra los resultados obtenidos a partir de dichas infusiones. ET-1 provocó un aumento en el contenido de ALDO citosólica de 12.2±1.8 ng/cáps. (control) a 28.4±3.4 ng/cáps. (tratado). La presencia de BQ-123 no modifica, significativamente, el incremento en el contenido de ALDO provocado por ET-1, observándose un valor de 22.2±1.9 ng/cáps. (ET-1 + BQ-123). A su vez, la infusión de S₆b, provocó un aumento en el contenido citosólico de ALDO, similar al producido por ET-1 (36.8±4 ng/cáps.). Estos resultados sugieren que ET-1 estaría estimulando la pro-

ducción de ALDO a través de la subpoblación de receptores ET_B , dado que por un lado, el efecto de ET-1 se puede mimificar con S_6b y por el otro, BQ-123 no revierte dicho efecto.

Ensayos realizados incubando directamente una suspensión celular de zona glomerulosa con ET-1, BQ-123 y S_6b , apoyan los resultados observados *in vivo*. La figura 4.6 (panel B) muestra los resultados obtenidos a partir de dichas incubaciones; ET-1 provoca un aumento en la producción de ALDO igual a 2.6 veces y S_6b mimifica ese efecto aumentando 3 veces la cantidad de ALDO formada. BQ-123 sólo, no produce variación con respecto al tratamiento control (0.98 ± 0.12 ng/ 10^5 cél. (control) vs 1.27 ± 0.34 ng/ 10^5 cél. (BQ-123)) y tampoco modifica los niveles de ALDO estimulados por ET-1 (2.53 ± 0.62 ng/ 10^5 cél. (ET-1) vs 3.0 ± 0.77 ng/ 10^5 cél. (ET-1 + BQ-123)).

De esta manera, ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* sugieren la participación de los receptores ET_B en el mecanismo de acción de ET-1 sobre la producción de esteroides. Estos resultados concuerdan con observaciones de otros investigadores, realizadas en cultivo de células de glomerulosa de ternero, donde S_6b incrementó la producción de ALDO [192].

4.2.3 Transducción de la Señal de ET

De acuerdo con lo reportado por otros autores, en cultivo de células de músculo liso vascular ET ejerce su acción vasoconstrictora a través de la activación de una fosfolipasa C (PLC) [197,285,242], liberando diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositoltrifosfato (IP_3) y, como consecuencia de ello, provoca un aumento en el contenido de Ca^{++} citosólico (ver [166] y sus ref.). Sin embargo, poco se sabe sobre el sistema de señales involucrado en las acciones de ET-1 sobre adrenal.

El abordaje experimental consistió en estudiar primeramente, la influencia de ET-1 en el contenido de los dos segundos mensajeros postulados DAG y Ca^{++} y luego, verificar, mediante el uso de inhibidores específicos, la posible participación de los mismos en el aumento de la producción de ALDO mediada por el péptido.

Contenido de DAG: La figura 4.7 muestra los niveles de monoacilglicerol (MAG), DAG y triacilglicerol (TAG) determinados en función del tiempo de incubación, a partir de ensayos realizados con células de glomerulosa en ausencia o presencia de ET-1 10^{-9} M. Los valores de radiactividad determinados en condiciones de no estimulación se mantuvieron estables durante los 10 minutos de incubación, indicando que el marcado radioactivo de los diferentes glicerolípidos había alcanzado un estado cercano al estacionario.

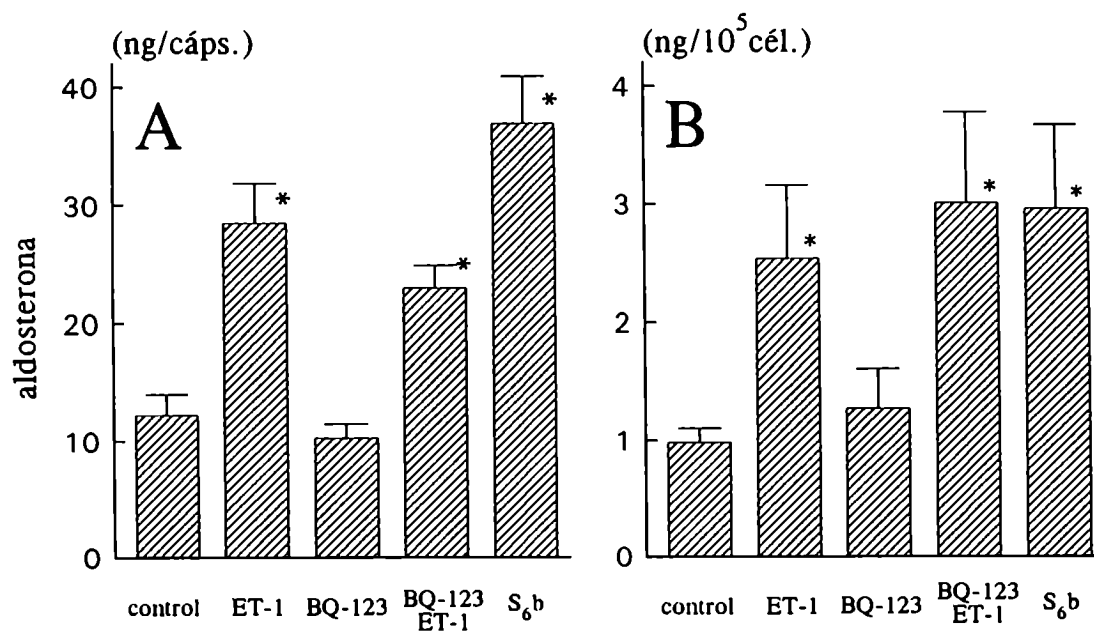


Figura 4.6: Receptores involucrados en la biosíntesis de ALDO

Ratas SD (panel A) o 10^5 cél de glomerulosa (panel B) se trataron con ET-1, S₆b, BQ-123 y BQ-123 + ET-1, de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 2. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ de 6 experimentos realizados por duplicado, siendo X la masa de ALDO producida. * $p < 0.05$ con respecto al control, (ANOVA).

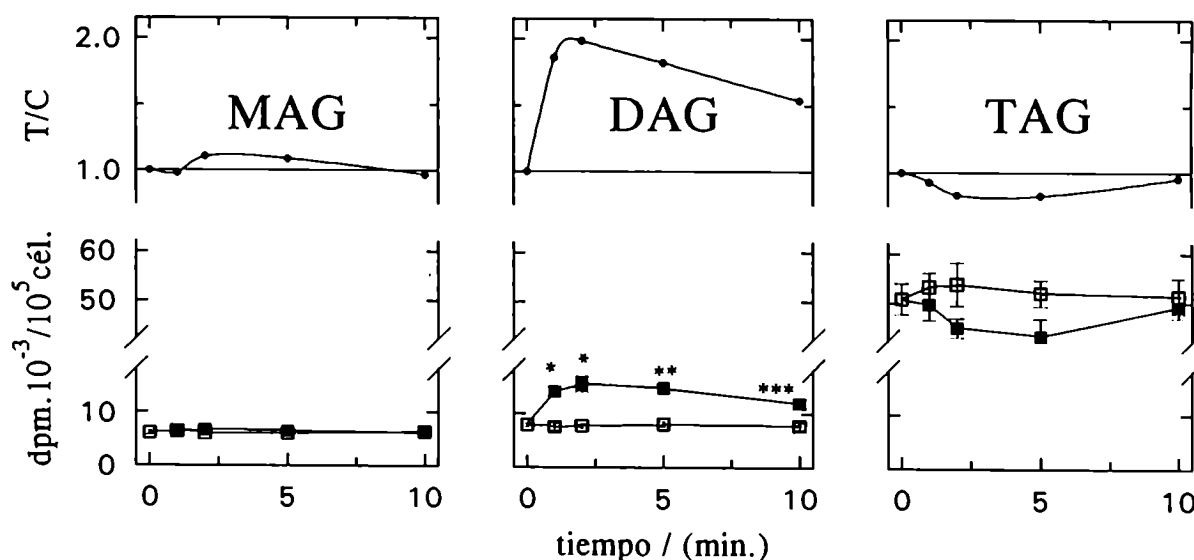


Figura 4.7: Efecto de ET-1 sobre el contenido de acilgliceroles

Células de glomerulosa cargadas previamente con $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-Glicerol}$ se incubaron en presencia de ET-1 10^{-9} M durante distintos tiempos. Los diferentes lípidos neutros se separaron por TLC y se cuantificó la radiactividad correspondiente a cada uno de ellos. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las dpm/ 10^5 cél. \square : sin ET-1, \blacksquare : con ET-1. En la parte superior se muestran las relaciones tratado/control (T/C) calculadas a partir de cada valor. Los valores corresponden a un experimento representativo, realizado por duplicado. *: $p < 0.02$; **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.05$.

Como se observa el contenido de MAG no es modificado por la presencia de ET-1 (panel A), manteniéndose la relación tratado/control cercana a 1 durante los 10 minutos de incubación. Sin embargo, en el panel B se observa que la formación de DAG mediada por ET-1 incrementa en función del tiempo alcanzando un máximo entre los dos y cinco minutos (relación tratado/control = 1.98). Este incremento indica que el péptido podría estar induciendo la hidrólisis de fosfolípidos vía la activación de PLC. Por otro lado, la producción de TAG (panel C), si bien es ligeramente disminuída por la presencia de ET-1, dicha disminución no supera el 20% con respecto al tratamiento control.

El análisis del contenido de fosfolípidos totales mostró que paralelamente al incremento

de DAG, el nivel de los fosfolípidos de membrana disminuye ligeramente luego de un minuto de tratamiento con ET-1 (tratado/control = 0.89 ± 0.03 vs tratado/control = 1 ± 0.06 para el tratamiento control). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el aumento de DAG provocado por ET-1 provendría principalmente de hidrólisis de fosfolípidos vía activación de la PLC.

El análisis de los fosfolípidos: fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina + fosfatidiletanolamina (PC + PE) no muestra diferencias significativas en el tratamiento con ET-1 con respecto a las incubaciones control, a todos los tiempos de incubación estudiados (ver Tabla 4.6). De todos modos, los mismos resultados evidencian una tendencia a la disminución en PI a los 2 min. seguida de una recuperación y aumento a los 10 min. Este esquema concordaría con la hipótesis de hidrólisis y/o disminución en el recambio de PI por activación de PLC (2 min.) seguido de un aumento en la resíntesis del fosfolípido (10 min.).

Tabla 4.6: Efecto de ET-1 sobre el contenido de fosfolípidos

tiempo (minutos)	PI (relación tratado/control)	PC + PE (relación tratado/control)
0	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
1	0.94 ± 0.05	1.06 ± 0.05
2	0.90 ± 0.06	1.13 ± 0.07
5	0.98 ± 0.04	0.93 ± 0.04
10	1.12 ± 0.05	0.97 ± 0.06

Células de glomerulosa cargadas previamente con $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-Glicerol}$ se incubaron en presencia de ET-1 10^{-9} M durante distintos tiempos. PI y PC + PE se separaron por TLC y se cuantificó la radiactividad correspondiente a los mismos. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de la dpm determinadas. Los valores corresponden a un experimento representativo, realizado por duplicado.

A fin de estudiar si el incremento de DAG mediado por ET-1 es a través de la misma población de receptores que los involucrados en la biosíntesis de ALDO, se realizaron incubaciones con ET-1, BQ-123 y S_6b . La figura 4.8 muestra los resultados obtenidos de esas incubaciones. MAG no es modificado por la presencia de ninguna de las sustancias ensayadas mientras que TAG disminuye ligeramente luego del tratamiento con ET-1.

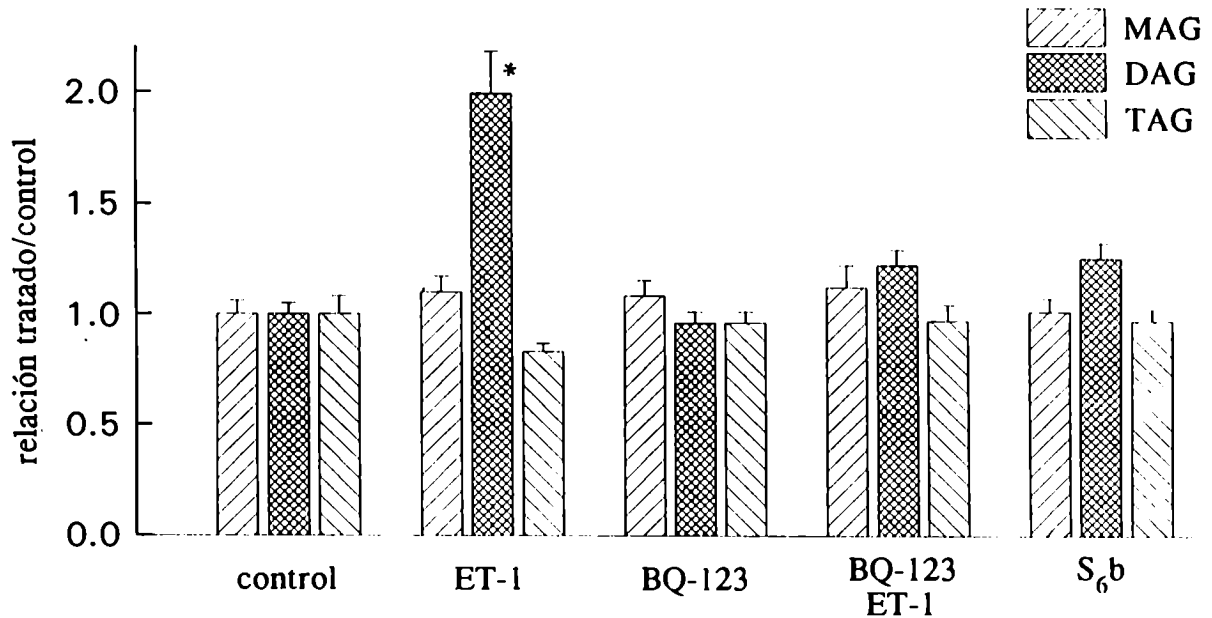


Figura 4.8: Receptores involucrados en el incremento de DAG

Células de glomerulosa cargadas previamente con $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-Glicerol}$ se incubaron en presencia de ET-1, S₆b, BQ-123y BQ-123+ET-1 durante 2 min.. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$ de dos experimentos realizados por duplicado, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las dpm determinadas. *: $p < 0.05$.

Sin embargo, DAG aumenta significativamente luego de dos minutos de tratamiento con ET-1 (tratado/control = 1.99 ± 0.19). La presencia de BQ-123 disminuye de 99% a 22% el efecto estimulador de ET-1 (tratado/control = 1.22 ± 0.07) pero no modifica los valores con respecto al tratamiento control (tratado/control = 0.96 ± 0.05). Por otro lado, S₆b estimula muy poco la producción de DAG siendo la relación tratado/control = 1.25 ± 0.07 .

Los resultados aquí presentados indican que ET-1 estimula la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana produciendo un incremento en el contenido de DAG; sin embargo, este efecto parece ser mediado principalmente por los receptores ET_A, dado que el aumento de DAG observado en las incubaciones con S₆b no supera el 25% con respecto al control y además, BQ-123 inhibe aproximadamente un 70% la acción de ET-1.

De esta manera, la acción esteroidogénica de ET-1 no sería mediada por un incremento en el contenido de DAG, dado que ha sido probado que la misma es a través de receptores

ET_B (ver sección 4.2.2). Estos resultados coinciden con los presentados por Woodcock *et al.* [280], quienes postulan que el incremento de IP₃ observado luego de incubar células de glomerulosa con ET, no media la acción esteroideogénica provocada por dicho péptido.

Es bien sabido que tanto el aumento de DAG como el Ca⁺⁺ liberado por la acción de IP₃ (resultantes de la hidrólisis de fosfolípidos de membranas) conducen a la activación de la proteína quinasa C (PKC). A fin de corroborar la participación o no de PKC en la aldosteronogénesis inducida por ET-1, se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando el inhibidor de quinasas H₇, que presenta una alta afinidad por dicha enzima.

Los experimentos *in vitro* consistieron en incubar células de glomerulosa con ET-1 10⁻⁹ M, en ausencia o en presencia de H₇ 100 μM. La figura 4.9 (panel A) muestra los resultados obtenidos en estos ensayos. La presencia de H₇ inhibe un 58% la biosíntesis de ALDO mediada por ACTH 10⁻⁹ M pero no afecta significativamente la producción de ALDO mediada por ET-1 (relación tratado/control: 1.25 y 1.38 para los tratamientos con ET-1 y ET-1 + H₇, respectivamente).

Los experimentos *in vivo* (figura 4.9 panel B) arrojaron resultados similares a los observados en las incubaciones con células aisladas. ET-1 80 ng.(kg. de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ aumenta 5.2 veces el contenido de ALDO citosólica. La presencia de H₇ no modifica el incremento observado con el tratamiento con ET-1 (relación tratado/control = 4.8), mientras que disminuye el aumento de ALDO provocado por ACTH a un 50% (relación tratado/control: 10.8 y 5.4 para los tratamientos con ACTH y con ACTH+H₇, respectivamente).

Estas observaciones concuerdan con las descritas por Cozza *et al.*, donde ni H₇ ni esfingosina (otro inhibidor de PKC) modifican el incremento de ALDO mediado por ET-1 en cultivo de células de glomerulosa de ternero [286].

Resumiendo, ET-1 incrementa la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana en zona glomerulosa adrenal; este efecto sería, principalmente, a través de los receptores ET_A. El aumento de DAG resultante de dicha hidrólisis no mediaría la activación de la producción de ALDO. Además, los ensayos realizados con H₇ indican que el efecto esteroideogénico de ET-1 no sería a través de una activación directa de quinasas sensibles a ese inhibidor, en particular de PKC.

Influjo de Ca⁺⁺: Se decidió, entonces, estudiar si el otro segundo mensajero propuesto para ET, el ión Ca⁺⁺, media el efecto aldosteronogénico del péptido. El aumento de Ca⁺⁺ citosólico puede ser debido a un incremento en la liberación del ión de los depósitos

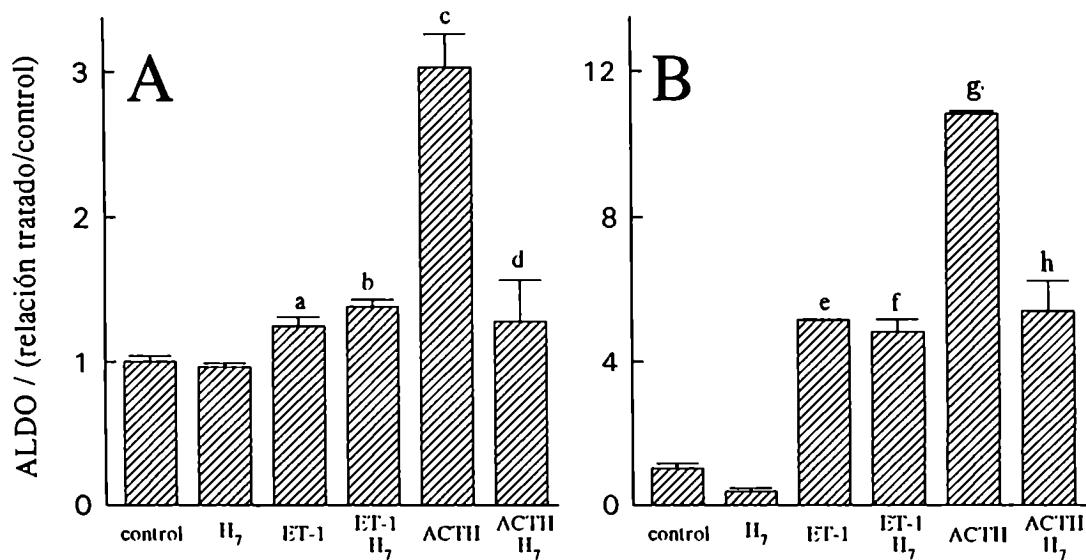


Figura 4.9: Efecto de H₇ sobre la biosíntesis de ALDO mediada por ET-1

Se trataron células de glomerulosa (panel A) o ratas Sprague Dawley (panel B) con ET-1, H₇, ACTH, ET-1+H₇ y ACTH+H₇ de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 2. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de ALDO, de dos experimentos realizados por duplicado (panel A) o tres animales ensayados para cada condición (panel B). a: $p < 0.05$ con respecto al control; b: $p < 0.05$ con respecto al control y $p < 0.02$ con respecto a H₇; c: $p < 0.02$ con respecto al control; d: $p < 0.05$ con respecto a ACTH; e: $p < 0.001$ con respecto al control; f: $p < 0.001$ con respecto al control y a H₇; g: $p < 0.0001$ con respecto al control y h: $p < 0.02$ con respecto a ACTH.

intracelulares en respuesta a la acción de IP_3 y/o a un mayor influjo del Ca^{++} externo. De acuerdo con los resultados presentados en la sección anterior (ver página 138), ET-1 provocaría la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares a través de su interacción con los receptores ET_A . Se sugiere entonces que de ser el aumento de Ca^{++} mediador de la respuesta esteroidogénica, dicho incremento sería debido principalmente a un mayor influjo del ión.

A fin de considerar esta posibilidad, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: primeramente se analizó si ET-1 produce algún efecto en el influjo de Ca^{++} (para ello se realizaron experimentos de captación de $^{45}CaCl_2$) y luego, mediante el uso de la droga verapamil que es un conocido bloqueante de algunos canales de Ca^{++} del tipo L (presentes en zona glomerulosa e involucrados en la esteroidogénesis adrenal [85]), se estudió si la presencia del mismo influye sobre la producción de ALDO mediada por ET-1.

Los ensayos de captación de Ca^{++} se realizaron de acuerdo con lo descrito por Miasiro *et al.* [242], aproximadamente 10^5 cél. se incubaron con ET-1 10^{-9} M, a los 30 seg de iniciada la incubación se agregó $^{45}CaCl_2$ (0.5 μ Ci) dejando transcurrir la misma durante 1 minuto.

En la figura 4.10 se observa que ET-1 incrementa el contenido de $^{45}Ca^{++}$ en células de glomerulosa, siendo la relación tratado/control = 1.71 ± 0.19 . A fin de analizar qué subpoblación de receptores se encuentra involucrada en el aumento del contenido de $^{45}Ca^{++}$ mediado por ET-1, se llevaron a cabo incubaciones en presencia de BQ-123. El antagonista de los receptores ET_A no altera el efecto provocado por ET-1 (tratado/control = 1.68 ± 0.27), así como tampoco modifica el nivel basal de Ca^{++} (tratado/control = 0.95 ± 0.01).

Estos resultados sugieren que el incremento del influjo de Ca^{++} mediado por ET-1 es a través de los receptores ET_B y de esta manera la entrada de Ca^{++} a la célula, podría ser una señal de ET-1 para provocar la biosíntesis de ALDO ya que ambos eventos ocurren a través de la misma subpoblación de receptores. Por otro lado, es bien sabido que el aumento del influjo de Ca^{++} ya sea por un incremento de la concentración de Ca^{++} extracelular, o mediante el uso de ionóforos como A_{23187} o de agonistas de canales de Ca^{++} como BAYK 8644 [37,78], estimula la producción de ALDO, lo cual apoyaría a los resultados aquí presentados.

Para confirmar esta posibilidad, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* a fin de estudiar si el incremento de ALDO mediado por ET-1 es dependiente de la apertura de canales específicos de Ca^{++} sensibles a verapamil. Para ello se incubaron células de glomerulosa con ET-1 1 nM, presencia de dos concentraciones de verapamil 10 μ M y 100 μ M. Se

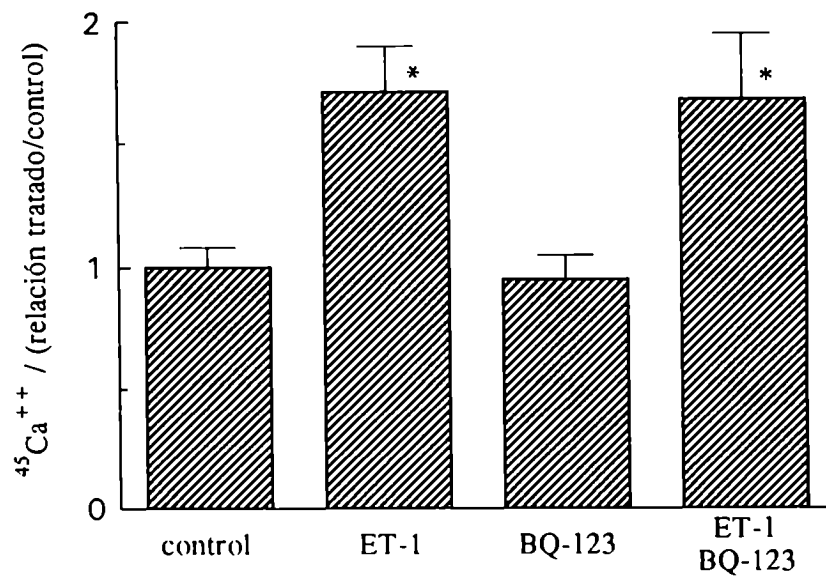


Figura 4.10: Inlujo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ mediado por ET-1

10^5 cél. se incubaron con ET-1 10^{-9} M durante 90 seg. a 37°C . A los 30 seg. de iniciada la incubación se agregó $^{45}\text{CaCl}_2$ ($0.5 \mu\text{Ci}$). Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{ES}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de la medición de la radioactividad asociada a las células. Los valores corresponden a 4 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

ensayó en paralelo ACTH 1 nM como control del efecto inhibitorio de verapamil.

La figura 4.11 muestra los resultados obtenidos de esos experimentos. El contenido de ALDO producido en condiciones de no estimulación fue 0.42 ± 0.02 ng/ 10^5 cél. ET-1 y ACTH estimularon la producción del esteroide siendo las relaciones tratado/control calculadas 2.2 y 4.1, respectivamente. La presencia de verapamil $10 \mu\text{M}$ disminuyó un 35% la estimulación provocada por ACTH; sin embargo, no modificó la producción de ALDO mediada por ET-1 (relación tratado/control = 2.4 para el tratamiento ET-1 + verapamil $10 \mu\text{M}$). Por otro lado, la concentración $100 \mu\text{M}$ del bloqueante de canales de Ca^{++} disminuye ligera pero significativamente la producción basal de ALDO (relación verapamil $100 \mu\text{M}$ /control = 0.82) y además verapamil provoca una inhibición total de la esteroidogénesis mediada por ACTH (relación ACTH+verapamil/verapamil = 1.14). Sin embargo, el efecto estimulador de ET-1 sobre la biosíntesis de ALDO sólo es inhibido un 65%, (relación ET-1+verapamil/verapamil = 1.39).

En paralelo, se estudió el efecto de verapamil sobre el influjo de Ca^{++} mediado por ET-1. Los resultados que se muestran en la tabla 4.7 concuerdan con los obtenidos en la respuesta aldosteronogénica. La tabla muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de la cuantificación de la radioactividad asociada a las células, en cada condición. La presencia de verapamil no modificó el influjo basal del ión, siendo las relaciones tratado/control igual a 0.95 y 0.88 para las concentraciones $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$, respectivamente. ET-1 estimuló la entrada de Ca^{++} 1.96 veces. La presencia de verapamil $10 \mu\text{M}$ no modificó la entrada de Ca^{++} mediada por ET-1, pero en cambio si lo hizo la concentración $100 \mu\text{M}$ (relación tratado/control = 1.39), sin embargo la inhibición provocada por esta concentración de verapamil no es total (38% de inhibición).

Los resultados aquí presentados sugieren que la esteroidogénesis provocada por ET-1 sería mediada, al menos en parte por la apertura de canales de Ca^{++} sensibles a verapamil. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que otro tipo de canal participe en dicho evento.

A fin de confirmar esta hipótesis se llevaron a cabo los ensayos *in vivo*. En la tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos a partir de infusiones con ET-1 $80 \text{ ng} \cdot (\text{Kg. de peso corporal})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, en presencia o ausencia de verapamil $160 \mu\text{g} \cdot (\text{Kg. de peso corporal})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. El nivel de ALDO determinado en animales control fue 40 ± 6 ng/cáp. ET-1 estimuló significativamente la esteroidogénesis, siendo la relación tratado/control determinada igual a 3.61 ± 0.24 . Verapamil produjo en algunos experimentos un leve incremento en la producción de ALDO con respecto al control, pero en otros la redujo, de

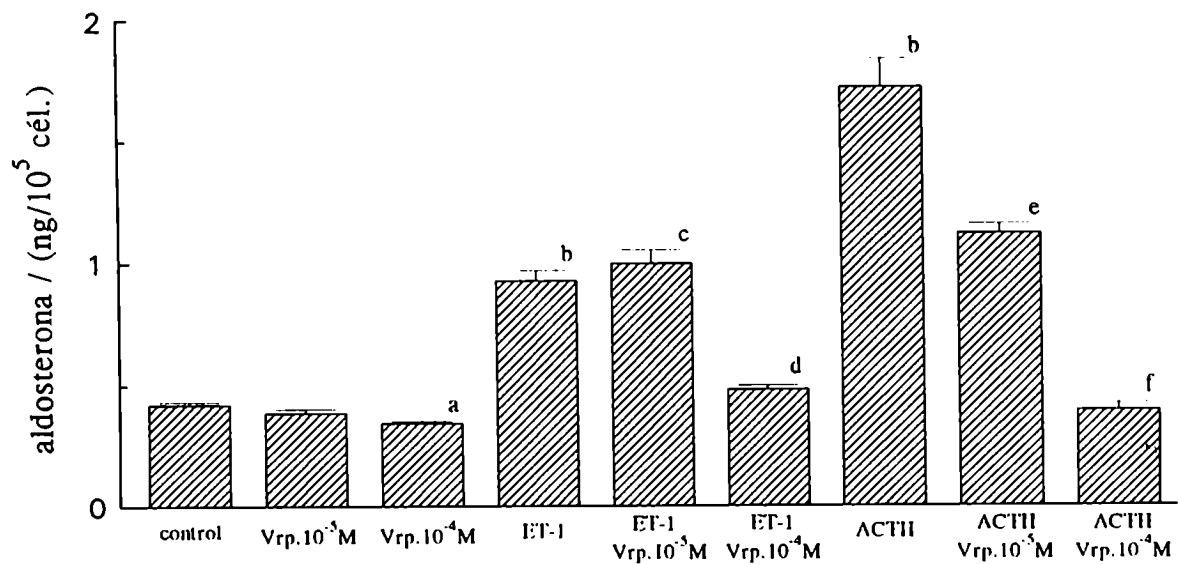


Figura 4.11: Efecto de verapamil sobre la biosíntesis de ALDO

Se incubaron células con ET-1 1 nM y ACTH 1 nM, en presencia de dos concentraciones de verapamil, de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo $X = \text{ng de ALDO}/10^5 \text{ cél.}$ de 2 experimentos realizados por duplicado. a: $p < 0.05$ con respecto al control, b: $p < 0.01$ con respecto al control, c: $p < 0.01$ con respecto a verapamil $10 \mu\text{M}$, d: $p < 0.01$ con respecto a ET-1 y $p < 0.05$ con respecto a verapamil $100 \mu\text{M}$, e: $p < 0.05$ con respecto a ACTH y $p < 0.01$ con respecto a verapamil $10 \mu\text{M}$ y f: $p < 0.01$ con respecto a ACTH, (ANOVA).

Tabla 4.7: Efecto de verapamil sobre el influjo de Ca^{++} mediado por ET-1

Tratamiento	Influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ (relación tratado/control)
Control	1.00 ± 0.09
Verapamil $10 \mu\text{M}$	0.95 ± 0.07
Verapamil $100 \mu\text{M}$	0.88 ± 0.07
ET-1 10^{-9} M	1.94 ± 0.30^a
ET-1 10^{-9} M + Verapamil $10 \mu\text{M}$	1.96 ± 0.18^b
ET-1 10^{-9} M + Verapamil $100 \mu\text{M}$	1.39 ± 0.17

10^5 cél. se incubaron con ET-1 durante 90 seg. a 37°C en presencia de verapamil (que había sido agregado a las células 20 seg. antes que el péptido). A los 30 seg. de iniciada la incubación con ET-1 se agregó $^{45}\text{CaCl}_2$ ($0.5 \mu\text{Ci}$). Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{ES}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de la medición de la radioactividad asociada a las células. a: $p < 0.05$ con respecto al control, b: $p < 0.01$ con respecto a verapamil $10 \mu\text{M}$, (ANOVA).

todas formas la relación tratado/control promedio, resultante de los cuatro experimentos realizados, fue 1.23 ± 0.6 . Además, la presencia de verapamil produjo una ligera disminución del efecto de ET-1 (relación ET-1+verapamil/verapamil = 2.23; ET-1+verapamil no da diferencias significativas con respecto al tratamiento con ET-1 ni con verapamil, pero el tratamiento con ET-1 sí las da con respecto al control, Tabla 4.8).

Los resultados presentados, provenientes de los ensayos *in vivo* apoyan a los experimentos *in vitro* y son congruentes con datos presentados por otros autores, que sugieren que la acción aldosteronogénica de ET-1 sería mediada sólo en parte por la apertura de canales sensibles a dihidropiridinas (ver [166] y sus ref.).

4.2.4 Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa Adrenal

Se ha postulado que en la glándula adrenal, la modulación de la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa podría influir en la producción de ALDO. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a ensayos realizados a fin de analizar la posible participación de ET-1 en la regulación de esa enzima y su relación con la producción de esteroides en zona glomerulosa.

Tabla 4.8: Efecto de verapamil sobre el incremento de ALDO mediado por ET-1

Tratamiento	ALDO citosólico (relación tratado/control)
Control	1.00±0.16
Verapamil	1.23±0.60
ET-1	3.61±0.24*
ET-1 + Verapamil	2.74±0.35

Los animales se infundieron de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Verapamil se infundió a $160 \mu\text{g} \cdot (\text{Kg} \cdot \text{min})^{-1}$ y ET-1 a $80 \text{ ng} \cdot (\text{Kg} \cdot \text{min})^{-1}$. Se determinó el contenido citosólico de ALDO. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X la relaciones tratado/control de 4 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.02$ con respecto al control.

Condiciones para la medición de la Na^+/K^+ -ATPasa sensible a ouabaína: Primeramente se establecieron las condiciones para la correcta medición de la actividad de la bomba. De acuerdo con lo descrito en el capítulo 2, la determinación de la actividad enzimática se realiza mediante la incubación de una dada cantidad de proteínas con el sustrato ATP, en presencia o ausencia del bloqueante ouabaína. De esta manera, los moles de P_i producidos específicamente por la acción de esa enzima, se calculan como la diferencia entre los moles de P_i resultantes de la acción de todas las ATPasas presentes en la preparación (valores obtenidos de las incubaciones con ATP solo) menos los moles de P_i producidos por la acción de aquellas ATPasas insensibles a ouabaína (valores obtenidos a partir de las incubaciones con ATP + ouabaína).

La figura 4.12 (panel A) corresponde a la función actividad enzimática *vs* tiempo; como puede observarse la actividad de la enzima presente en homogenatos de zona glomerulosa, es lineal hasta los 20 minutos de transcurrida la reacción. Se decidió entonces, realizar los experimentos subsiguientes utilizando un tiempo de incubación de 15 minutos.

Por otro lado, en la figura 4.12 (panel B) se observa que para la concentración de sustrato ATP 3 mM, se mantiene una relación lineal entre la actividad enzimática ensayada y la cantidad de proteínas presentes en los homogenatos hasta un valor de $300 \mu\text{g}$ de proteínas. Se decidió trabajar con cantidades que estuvieran incluidas dentro de este rango. La actividad enzimática en la fracción microsomal se midió bajo las mismas condiciones.

Una vez puesto a punto el ensayo de medición de Na^+/K^+ -ATPasa sensible a ouabaína,

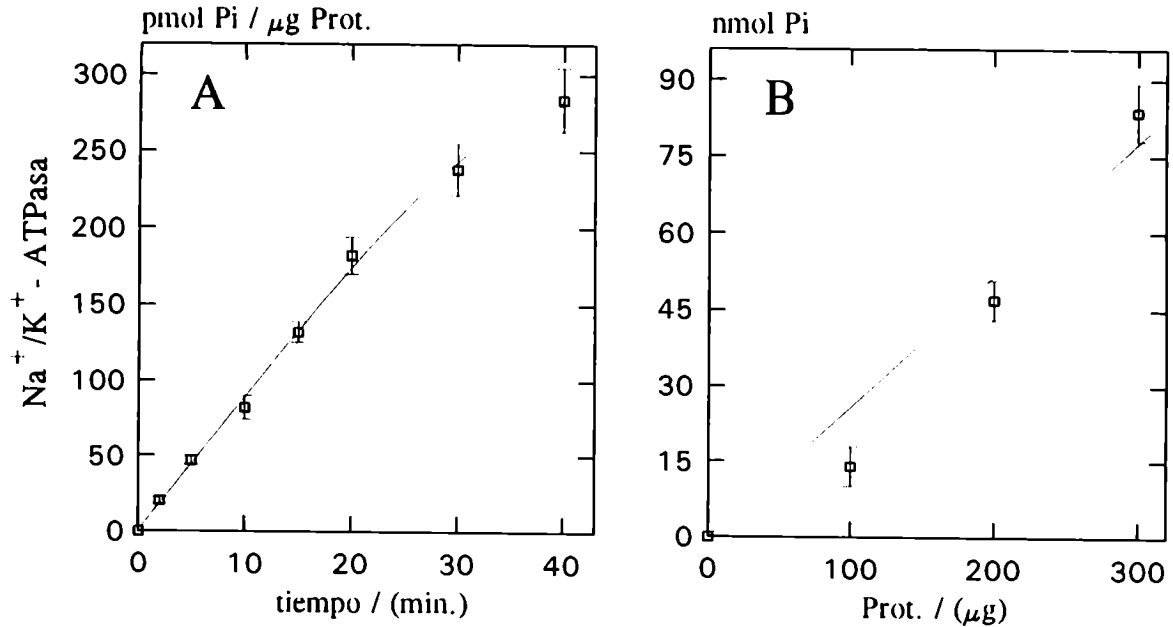


Figura 4.12: Actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa

Homogenato de zona glomerulosa se incubó 37°C con ATP 3 mM, en presencia o ausencia de ouabaína 10⁻³ M. Panel A: 300 μg de prot. durante diferentes tiempos. Panel B: distintas cantidades de proteínas durante 20 minutos. Los puntos de la curva corresponden a pmol de P_i/μg de prot (panel A) y nmol de P_i (panel B), resultantes de la diferencia entre los producidos en ausencia y en presencia de ouabaína.

se estudió la acción de ET-1 sobre la actividad de la enzima.

Acción de ET-1: Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* que consistieron en ensayar la actividad enzimática en homogenatos o fracciones microsomales de zonas glomerulosa o fasciculata provenientes de animales infundidos con ET-1 80 ng .(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ a flujo = 125 μ l/min.

La tabla 4.9 muestra los resultados obtenidos a partir de experimentos llevados a cabo con la cepa de ratas Sprague Dawley. ET-1 incrementa la actividad de la enzima, siendo la relación tratado/control = 4.78 en homogenatos de glomerulosa adrenal y 5.31 en la fracción microsomal. En zona fasciculata, la actividad basal de la bomba es menor que en la glomerulosa, 81 \pm 4 pmol P_i/μg prot. vs 141 \pm 9 pmol P_i/μg prot. para los homogenatos respectivos y, 267 \pm 25 pmol P_i/μg prot. vs 478 \pm 24 pmol P_i/μg prot. para sendas fracciones microsomales. ET-1 no produce variación alguna en la actividad de la enzima presente en zona fasciculata.

Tabla 4.9: Actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa (*in vivo*)

Fracciones		Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (pmol P _i / μg de prot.)	
		Control	ET-1
homogenato	glomerulosa	141 \pm 9	674 \pm 43 ^b
	fasciculata	81 \pm 4 ^a	77 \pm 3
microsomias	glomerulosa	478 \pm 24	2538 \pm 2 ^c
	fasciculata	267 \pm 25 ^a	294 \pm 18

Los animales se infundieron con ET-1 de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Finalizadas las infusiones se extrajeron cápsula y core adrenal, sendas zonas se homogeneizaron y a partir de una fracción de homogenato se obtuvieron microsomas. Se determinó la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ de 3 experimentos realizados por duplicado, siendo X pmol P_i/μg de prot. (determinadas por Bradford). a: p<0.02 con respecto a glomerulosa; b: p<0.01 con respecto al control; c: p<0.001 con respecto al control, (ANOVA).

Los estudios *in vivo* se completaron con experimentos llevados a cabo *in vitro*: células de zona glomerulosa adrenal fueron estimuladas con ET-1 10⁻⁹ M y luego la actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa se ensayó en homogenatos provenientes de dichas incubaciones.

Se realizaron cinco experimentos por duplicado, los valores correspondientes a la actividad basal de la enzima obtenidos de cada uno de esos ensayos abarcaron un rango entre 3 y 137 (nmol de P_i /10⁵ cél.). Las diferencias de la actividad basal de Na^+/K^+ -ATPasa, observadas entre los experimentos, probablemente se deben a diferentes estados hídricos y metabólicos de los animales. ET-1 incrementó la actividad de la enzima en todos los experimentos realizados pero las relaciones tratado/control calculadas para cada experimento variaron entre 2 y 6.4 veces en cuatro de los cinco experimentos y 38 veces en el experimento restante.

De acuerdo con los resultados arriba presentados, ET-1 produce un incremento en la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa sensible a ouabaína tanto en los experimentos *in vivo* como en las incubaciones con células. La acción de ET-1 sobre la actividad de la enzima ha sido reportada también por otros investigadores [273]. En la línea celular A10 ET-1 activa a la enzima [287] y por otro lado, en células epiteliales de túbulo renal ET-1 inhibe a Na^+/K^+ -ATPasa [288]. Es posible que ese efecto inhibitorio sea mediado por receptores diferentes a los involucrados en la activación de la enzima en adrenal o que existan respuestas a ET-1 específicas de cada tipo celular. Es sabido que A II inhibe la actividad de la enzima presente en la glándula adrenal y activa a Na^+/K^+ -ATPasa de vaso, así la acción dependiente del tejido no es extraña en estos péptidos vasoactivos y aldosteronogénicos.

Dado que se ha postulado que la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ está involucrada en el proceso de tensión vascular, se decidió estudiar el efecto de ET-1 sobre la actividad de la enzima de ratas SS (que presentan hipertensión por dieta con alta sal) y SR (resistentes a la dieta con alto contenido de Na^+). Estas respuestas se compararon con las respuestas producidas por animales normales (la cepa SD y CHBB-THOM).

La figura 4.13 presenta las relaciones tratado/control calculadas a partir de los valores de actividad enzimática, determinados para los homogenatos de zona glomerulosa provenientes de las distintas condiciones de infusión. Los valores de actividad basal para las diferentes cepas utilizadas son similares: SD=131±9; CHBB-THOM=140±7 y SR=97±6 pmol P_i /μg de prot. El nivel de actividad basal de Na^+/K^+ -ATPasa en la cepa SS es ligeramente superior con respecto a las demás cepas estudiadas (193±10 pmol P_i /μg de prot.).

ET-1 provoca un aumento significativo de la actividad de la enzima en las cepas SD, CHBB-THOM y SR, siendo las relaciones tratado/control: 4.79±0.48, 5.31±0.85 y 4.82±0.67, respectivamente. En la cepa SS se observa un incremento mucho menor de la actividad enzimática (tratado/control = 2.42±0.36).

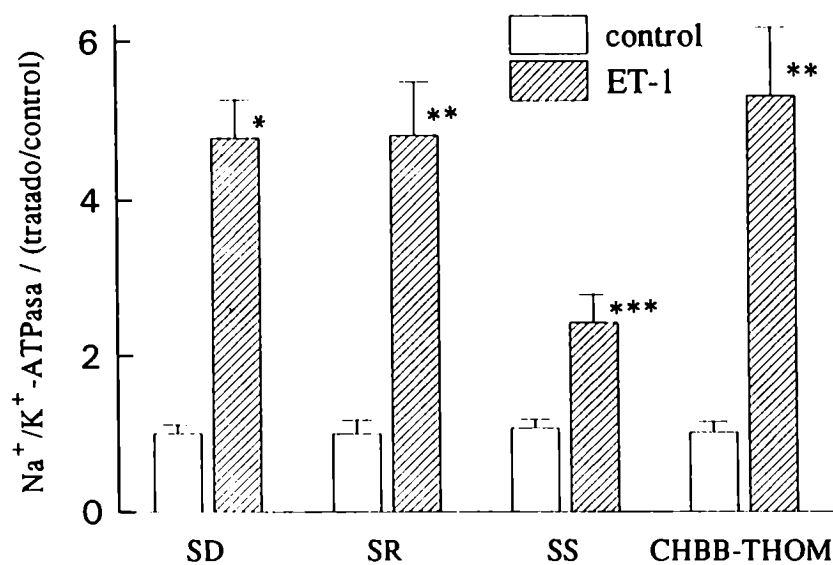


Figura 4.13: Actividad de Na^+/K^+ -ATPasa en diferentes cepas de animales
 A homogenatos de zona glomerulosa provenientes de animales tratados con ET-1 (ver capítulo 2), se les determinó la actividad Na^+/K^+ -ATPásica. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$ siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de los datos obtenidos de 6 animales utilizados para cada condición. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.02$ y ***: $p < 0.05$, con respecto al control respectivo.

Dado que la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa está involucrada en la modulación de la presión arterial, los distintos valores basales y el grado de estimulación de dicha enzima por ET-1 en la cepa SS podrían estar relacionados con la aumentada sensibilidad de esta cepa de ratas a desarrollar hipertensión por ingestión de sal y a poseer un valor de presión arterial media superior al de las cepas consideradas normales (SD, CHBB-THOM y SR).

Receptores involucrados: Se realizaron estudios a fin de delucidar qué subpoblación de receptores a ET-1 es la responsable de la activación de la enzima en cápsula adrenal. Para ello, se llevaron a cabo infusiones con ET-1 en presencia o ausencia de BQ-123, o infusiones con S_6b . La figura 4.14 muestra los resultados de los ensayos realizados en homogenatos y microsomas de zona glomerulosa o zona fasciculata. El incremento de la actividad de la enzima de homogenato de cápsula adrenal provocado por previa infusión con ET-1 (panel A) (674 ± 43 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. vs 141 ± 9 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. para el tratamiento control), no es modificado por la presencia del antagonista de los receptores ET_A , BQ-123 (644 ± 45 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. para ET-1 + BQ-123). Además, S_6b mimifica el efecto de ET-1 (517 ± 59 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot.). BQ-123 no modifica la actividad basal de la enzima (136 ± 7 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot.).

En homogenatos de la zona fasciculata (panel B) ninguno de los tratamientos ensayados modifica la actividad enzimática basal, que corresponde a 81 ± 4 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot.

Estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos a partir de fracciones microsomales (paneles C y D). En el panel C se presentan los valores de actividad enzimática correspondiente a microsomas de cápsula adrenal. La activación de Na^+/K^+ -ATPasa mediada por ET-1 (2538 ± 2 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. vs 478 ± 24 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. para el tratamiento control), no es modificada por la presencia del antagonista de BQ-123 (2314 ± 149 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot. para ET-1 + BQ-123). En fasciculata (panel D) ninguno de los tratamientos produce variación con respecto al tratamiento control que es igual a 267 ± 25 pmol $\text{P}_i/\mu\text{g}$ de prot.

Por otro lado, incubaciones realizadas con preparaciones de células de glomerulosa arrojaron resultados semejantes a los obtenidos en los ensayos *in vivo*. La tabla 4.10 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de las incubaciones realizadas con ET-1 10^{-9} M y el agonista de receptores ET_B , S_6b 10^{-9} M. Los niveles basales de la actividad de la enzima presentaron diferencias significativas entre los experimentos, siendo el rango de valores abarcados entre 6.6 y 137 nmol $\text{P}_i/10^5$ cél.

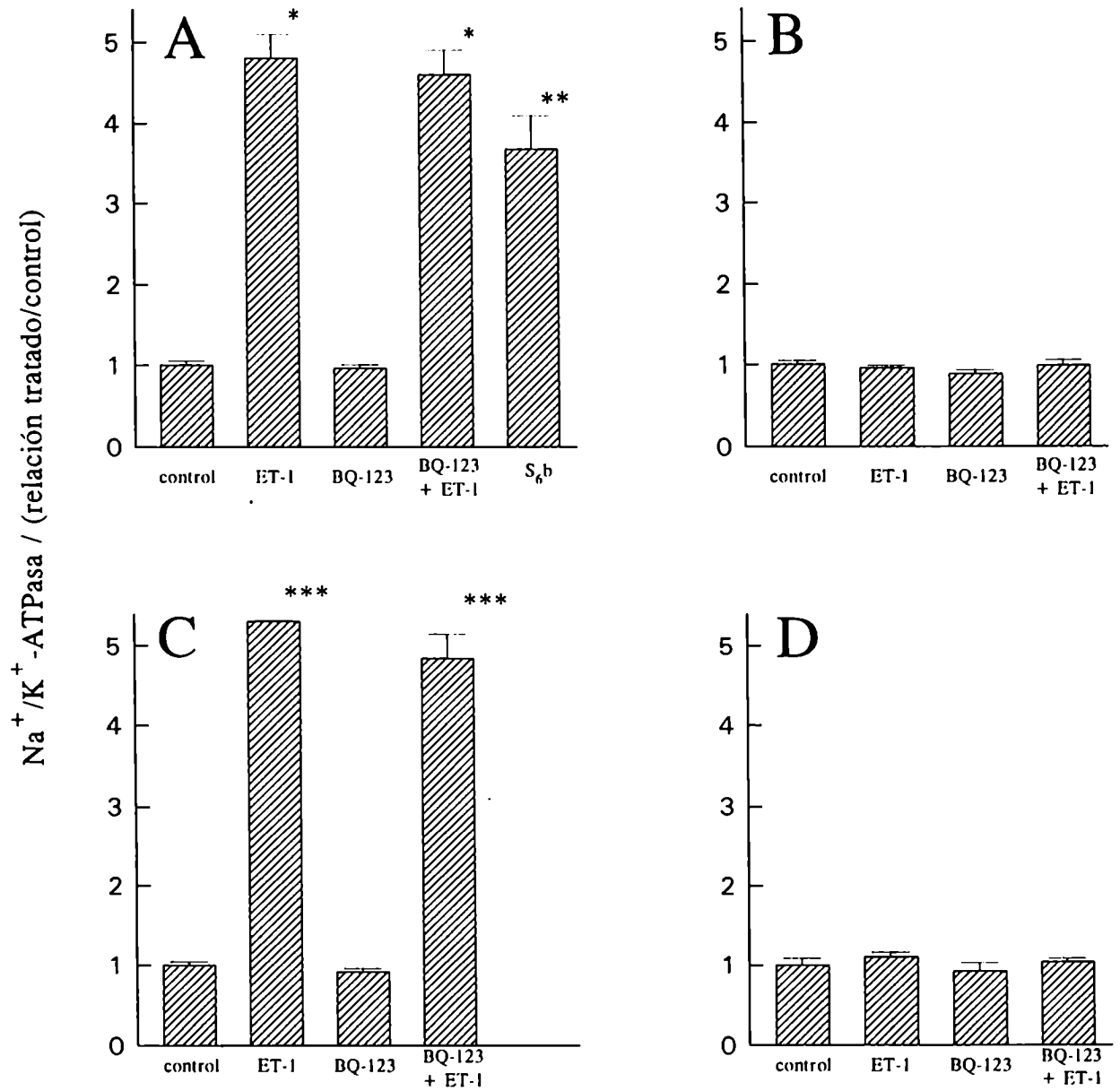


Figura 4.14: Subpoblación de receptores involucrada en la actividad Na⁺/K⁺-ATPásica. Se infundieron ratas SD con ET-1, BQ-123, S₆b, ó ET-1 + BQ-123. Finalizadas las infusiones se determinó la actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de los datos obtenidos de 6 animales utilizados para cada condición. Paneles A y B: homogenato, paneles C y D: fracción microsomal, paneles A y C: zona glomerulosa y paneles B y D: zona fasciculata. *: p<0.01; **: p<0.02 y ***: p<0.001 (con respecto al control, ANOVA).

Tabla 4.10: Receptores involucrados en la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa (*in vitro*)

tratamiento	Na^+/K^+ -ATPasa (relación tratado/control)
control	1.00 ± 0.38
ET-1 10^{-9} M	3.09 ± 0.73^a
S_{6b} 10^{-9} M	4.15 ± 0.85^b

10^5 cél. se trataron con ET-1 o S_{6b} de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Luego se determinó se la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$ siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de las determinaciones de P_i de 4 experimentos realizados por duplicado. a: $p < 0.05$ y b: $p < 0.02$ (con respecto al control, ANOVA).

De acuerdo con los resultados presentados, en cápsula adrenal ET-1 activaría la bomba dependiente de Na^+ y K^+ a través de la subpoblación de receptores ET_B , la misma población que la involucrada en la acción esteroideogénica de dicho péptido, sugiriéndose así una posible relación entre la activación de la enzima y el aumento en la producción de ALDO.

4.2.5 Relación Producción de ALDO y Actividad de Na^+/K^+ -ATPasa

Se ha demostrado en las secciones anteriores que ET-1 estimula por un lado la producción de ALDO (sección 4.2.2) y por el otro la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa (sección 4.2.4). Ambos estímulos serían a través de la misma población de receptores.

Con el objeto de conocer si existe algún vínculo directo entre la activación de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ y la estimulación de la biosíntesis de ALDO mediadas por ET-1, se llevaron a cabo experimentos que consistieron en determinar los efectos de ouabaína sobre la producción basal de ALDO y sobre la estimulada por ET-1.

Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO: En la figura 4.15 se presenta la curva correspondiente a la inhibición de la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa en función de la concentración de ouabaína suministrada. Esta curva se construyó con los resultados obtenidos de ensayos realizados, incubando homogenatos de zona glomerulosa

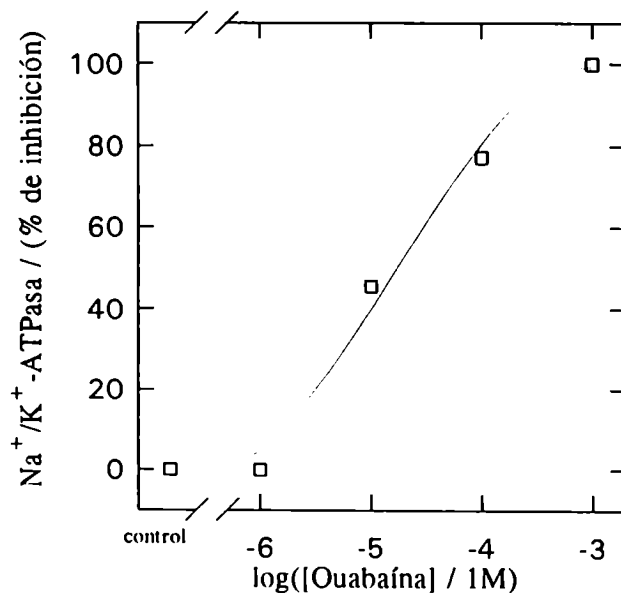


Figura 4.15: Inhibición de la actividad Na^+/K^+ -ATPásica por ouabaína
 200 μg de prot. de homogenato de cápsula adrenal se incubaron con ATP 3 mM, en presencia de concentraciones crecientes de ouabaína. Los valores corresponden a porcentajes de inhibición calculados, tomando como 100% al obtenido con ouabaína 10^{-3} M.

(200 μg de prot.) con el sustrato ATP, en presencia de concentraciones crecientes de ouabaína que abarcaron un rango entre 10^{-6} M y 10^{-3} M. Como puede observarse, ouabaína inhibe de manera dosis dependiente la actividad de la bomba, siendo alcanzada la máxima inhibición con la concentración de ouabaína 10^{-3} M (49.31 nmol P_i /inc. vs 60.05 nmol P_i /inc. para el tratamiento control). La curva se construyó definiendo como 100% de inhibición a la obtenida con esa concentración 10^{-3} M y calculando por interpolación, los porcentajes de inhibición correspondientes a las demás concentraciones de ouabaína ensayadas. A partir de la concentración 10^{-5} M puede visualizarse una inhibición significativa de la actividad de la enzima, estimándose el IC_{50} en 16 μM . La forma monofásica de la curva de inhibición de Na^+/K^+ -ATPasa sugiere que la cápsula adrenal de rata posee un sólo tipo de isoenzima, que por el IC_{50} calculado, correspondería a la forma α . Este resultado está de acuerdo con lo descrito por Sweadner *et al.* [289].

La producción de ALDO mediada por ouabaína se muestra en la figura 4.16. Los

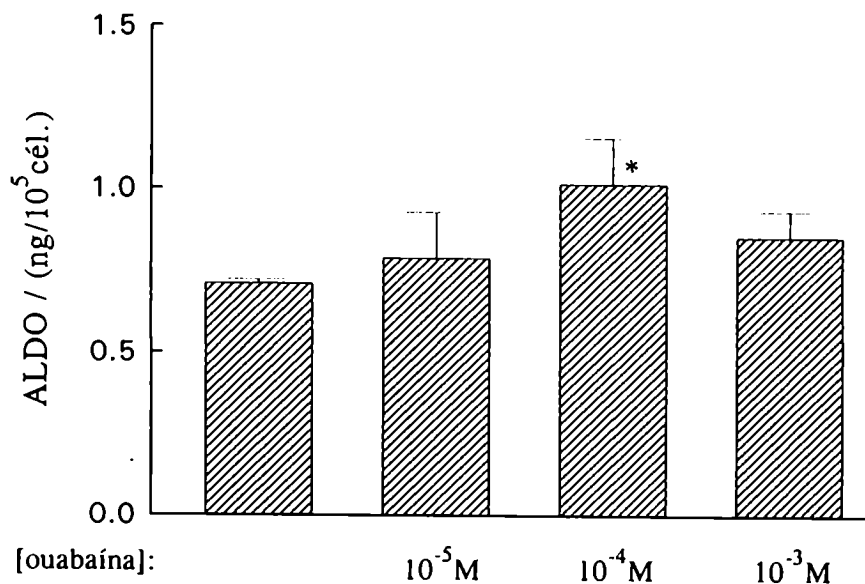


Figura 4.16: Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO

10⁵ cél. de glomerulosa se incubaron con diferentes concentraciones de ouabaína. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ siendo X los ng de ALDO/10⁵ cél. Los resultados son promedios de 2 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

ensayos se llevaron a cabo incubando 10⁵ células de glomerulosa con concentraciones de ouabaína que abarcaron un rango entre 10⁻⁵ M y 10⁻³ M. La curva resultó ser bifásica, alcanzándose un máximo de estimulación con la concentración de ouabaína 10⁻⁴ M (relación tratado/control = 1.4). Observando la figura 4.15. esa concentración de ouabaína, que produce la máxima estimulación de la producción de ALDO, provoca una inhibición parcial de la actividad de la bomba dependiente de Na⁺ y K⁺ (70% de inhibición). Sin embargo, cuando la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa se encuentra totalmente inhibida (ouabaína 10⁻³ M), la producción de ALDO no es significativamente diferente al tratamiento control.

Datos previos del efecto de ouabaína sobre la aldosteronogénesis, son bastantes contradictorios (ver [137] y sus ref.). Sin embargo, los resultados aquí presentados coinciden con los descriptos por otros autores [114,156,47].

Ha sido propuesto que una inhibición parcial de la actividad Na⁺/K⁺-ATPásica produciría una despolarización de la membrana plasmática conduciendo a una mayor entrada

de Ca^{++} y en consecuencia un aumento en la biosíntesis de ALDO, mientras que la inhibición total de la bomba desencadenaría un caos iónico tal que se afectaría la respuesta celular en su conjunto [47].

Esta propuesta es apoyada por resultados obtenidos de incubaciones donde se determinó el influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ mediado por ouabaína. La tabla 4.11 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir de la radioactividad asociada a las células. Ouabaína aumenta el influjo de Ca^{++} , alcanzando un máximo con la concentración 10^{-4} M (relación tratado/control = 1.88).

Tabla 4.11: Acción de ouabaína sobre el influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$

tratamiento	Influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ (relación tratado/control)
control	1.00 ± 0.09
ouabaína 10^{-5} M	1.17 ± 0.11
ouabaína 10^{-4} M	$1.88 \pm 0.26^*$
ouabaína 10^{-3} M	$1.69 \pm 0.20^*$

10^5 cél. se trataron con ouabaína durante 90 seg. A los 30 seg. de iniciada la incubación se agrego $^{45}\text{CaCl}_2$ ($0.5 \mu\text{Ci}$). Luego se determinó la radioactividad asociada a las células de acuerdo con lo descrito en el capítulo 2. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$ siendo X las relaciones tratado/control. *: $p < 0.05$ con respecto al control, (ANOVA).

Por otro lado tanto el aumento del influjo de Ca^{++} como la producción de ALDO, mediados por ouabaína 10^{-4} M, fueron bloqueados por la presencia de verapamil. La figura 4.17 muestra los resultados obtenidos de esas incubaciones. Ouabaína estimuló el influjo de Ca^{++} 1.88 veces y la producción de ALDO 1.75. Sin embargo, la presencia de verapamil $100 \mu\text{M}$ inhibió totalmente ambas acciones del glicósido.

Estos resultados sugieren, entonces, que ouabaína al inhibir parcialmente la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa estaría provocando una alteración en el potencial de membrana y en consecuencia la apertura de canales de Ca^{++} voltaje-dependiente. Este incremento en la entrada de Ca^{++} a la célula estimularía la producción de ALDO.

Efecto de ouabaína sobre la biosíntesis de ALDO mediada por ET-1: Ha sido descrito que ouabaína produce inhibición de la estimulación de la biosíntesis de ALDO

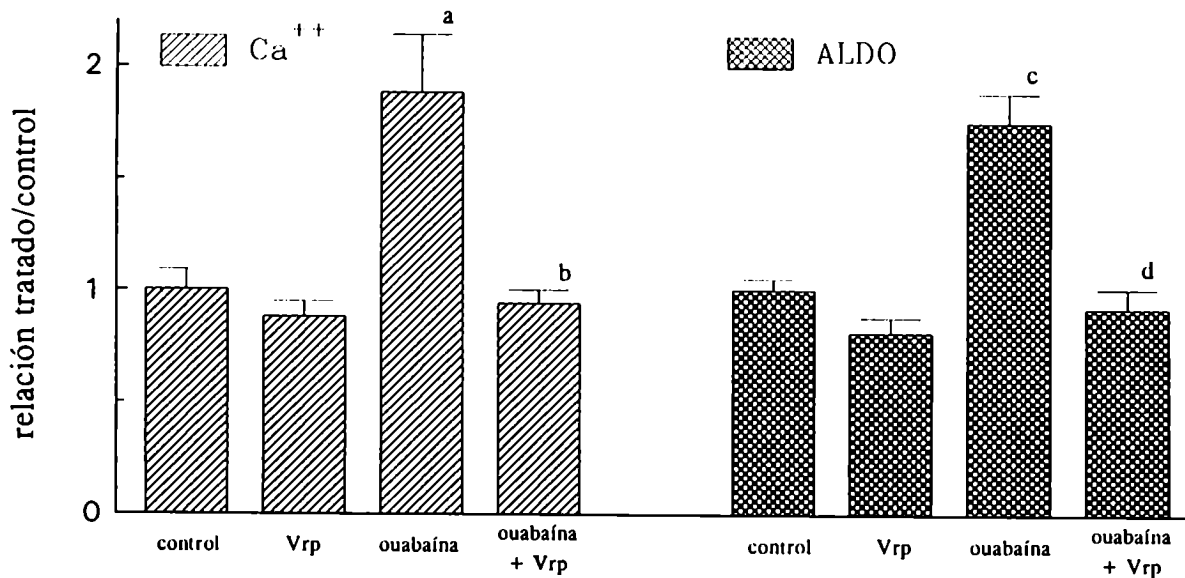


Figura 4.17: Inhibición por verapamil de las acciones de ouabaína en adrenal 10^5 cél. de glomerulosa se incubaron con ouabaína 10^{-4} M de acuerdo con los protocolos detallados en el capítulo 2. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$ siendo \bar{X} las relaciones tratado/control. Panel A: producción de ALDO, panel B: influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$. a: $p < 0.05$ con respecto al control, b: $p < 0.05$ con respecto a ouabaína, c: $p < 0.02$ con respecto al control y d: $p < 0.02$ con respecto a ouabaína. Vrp: verapamil $100 \mu\text{M}$.

mediada por ACTH y A II [114,115]. Con el fin de comprobar esas observaciones se realizaron experimentos incubando células de glomerulosa con ACTH 10^{-9} M en presencia de concentraciones crecientes de ouabaína; la figura 4.18 muestra los niveles de ALDO producidos en cada condición. En la parte superior de la figura se esquematizan las relaciones tratado/control correspondientes al cociente entre los valores obtenidos en presencia *vs* en ausencia de ACTH para cada concentración de ouabaína ensayada.

ACTH estimuló 4.7 veces la producción de ALDO y este efecto fue modificado por la presencia de ouabaína. A concentraciones bajas, ouabaína produce un ligero pero no significativo incremento en la biosíntesis de ALDO mediada por ACTH (36 ± 3 ng/ 10^5 cél. para el tratamiento ACTH + ouabaína *vs* 33 ± 3 ng/ 10^5 cél. para las tratadas con ACTH). A concentraciones mayores, ouabaína provoca una significativa inhibición de la producción de ALDO mediada por ACTH alcanzando un porcentaje de inhibición igual a 33% con una concentración de ouabaína igual a 10^{-3} M.

Se estudió entonces, si el efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO mediada por ET-1 es similar al observado para ACTH.

La figura 4.19 muestra los resultados obtenidos a partir de esos experimentos. Células de glomerulosa se incubaron con tres concentraciones diferentes de ET-1 (panel A: 10^{-11} M, panel B: 10^{-10} M y panel C: 10^{-9} M), en presencia de concentraciones crecientes de ouabaína. ET-1 estimuló en forma dosis dependiente la producción de ALDO mientras que ouabaína, a la concentración 10^{-3} M (que provoca la máxima inhibición de Na^+/K^+ -ATPasa) potencia la acción de ET-1. Los porcentajes de potenciación se calcularon de acuerdo con la ecuación 4.1:

$$P\% = 100 \frac{EO - E - O + C}{E + O - 2C}, \quad (4.1)$$

donde *EO* corresponde al efecto provocado por ET-1 y ouabaína juntos, *E* al efecto de ET-1, *O* al efecto de ouabaína y *C* es el valor control.

Los máximos porcentajes de potenciación obtenidos fueron 104%, 39.7% y 24,3% para las concentraciones 10^{-11} M (panel A), 10^{-10} M (panel B) y 10^{-9} M (panel C), respectivamente.

Estos resultados demuestran que ET-1 y ouabaína, a las concentraciones ensayadas estarían actuando sinérgicamente sobre la biosíntesis de ALDO. Este efecto sinérgico de ouabaína es opuesto a la inhibición que el glicósido provoca sobre la producción de ALDO mediada por otros estimuladores (*i.e.* ACTH y A II). Una probable explicación es que el caos iónico, que produce la concentración alta de ouabaína, sea revertido por la pre-

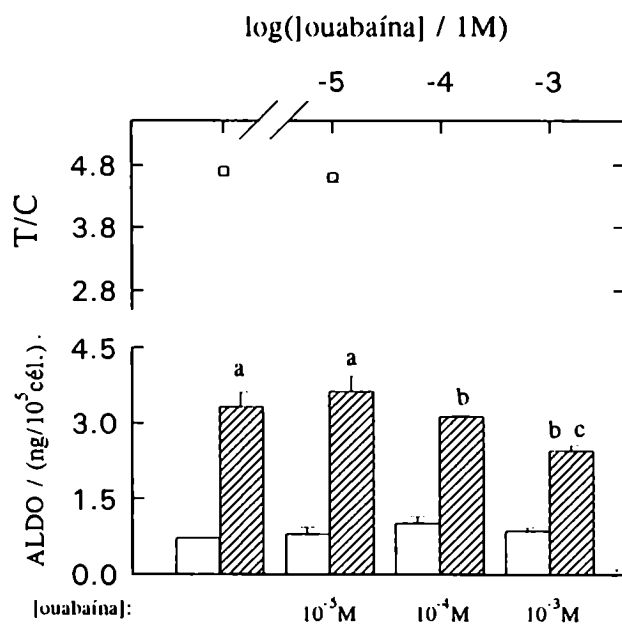


Figura 4.18: Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO mediada por ACTH. 10^5 cél. de glomerulosa se incubaron con ACTH 10^{-9} M en presencia de diferentes concentraciones de ouabaína. La porción inferior del gráfico representa los valores correspondientes a $\bar{X} \pm SE$ de 2 experimentos realizados por duplicado, siendo X los ng de ALDO/ 10^5 cél. □: sin ACTH y ▨: con ACTH. T/C corresponde al cociente calculado a partir de las determinaciones realizadas con ACTH con respecto a sin ACTH. a:p<0.02; b:p<0.01 y c:p<0.05.

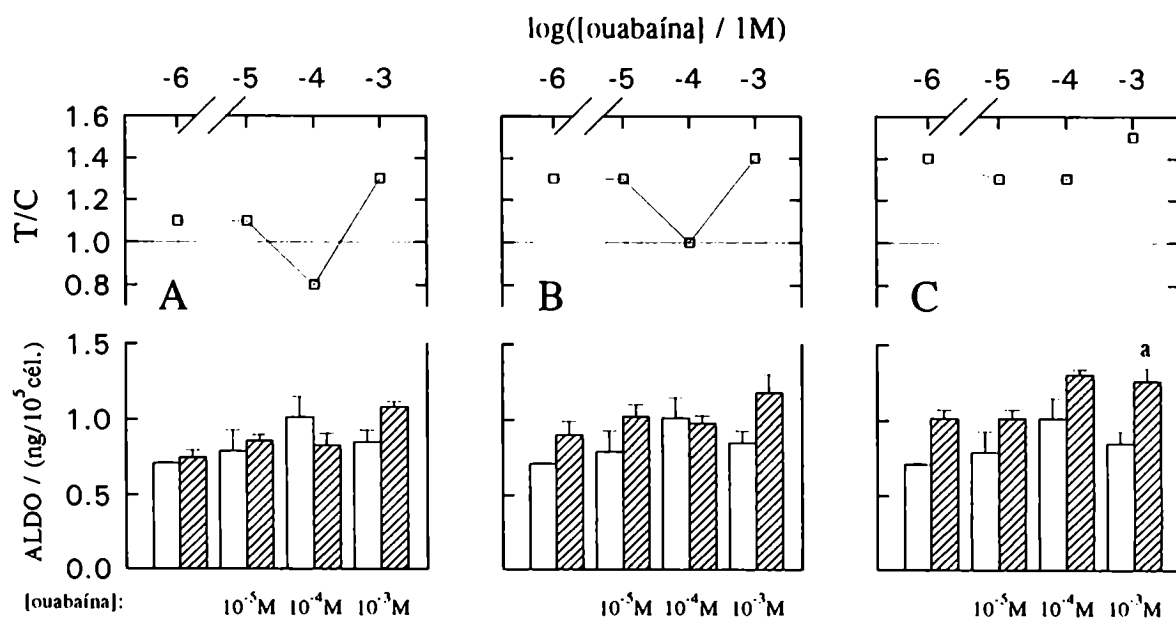


Figura 4.19: Efecto de ouabaína sobre la producción de ALDO mediada por ET-1. 10^5 cél. de glomerulosa se incubaron con ET-1 10^{-11} M (panel A); 10^{-10} M (panel B) y 10^{-9} M (panel C). en presencia de diferentes concentraciones de ouabaína. La porción inferior del gráfico representa los valores correspondientes a $\bar{X} \pm SE$, (de 2 experimentos realizados por duplicado) siendo \bar{X} los ng de ALDO/ 10^5 cél. □: sin ET-1 y ▨: con ET-1. T/C corresponde al cociente calculado a partir de las determinaciones realizadas con ET-1 con respecto a sin ET-1. a: $p < 0.05$ con respecto a ouabaína sólo.

sencia de ET-1, que activa a Na^+/K^+ -ATPasa. Por otro lado, ambas sustancias estimulan la entrada de Ca^{++} a la célula, ouabaína a través de canales sensibles a verapamil (ver figura 4.17) y ET-1 mediante la apertura de canales sensibles a verapamil pero también por algún otro mecanismo desconocido (ver figura 4.11). Ambos efectos conducirían al sinergismo producido entre las dos sustancias.

Otra posibilidad es que la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa mediada por ET-1 actúe como freno o señal de terminación para la estimulación de la producción de ALDO mediada por la hormona. Así, al disminuir la actividad de la enzima con ouabaína, la producción de ALDO mediada por ET-1 es mayor.

4.2.6 Incorporación de colesterol mediada por ET-1

De acuerdo con los resultados presentados en la sección 4.2.1, ET-1 no sólo activa a las enzimas esteroideogénicas que participan de la conversión DOC en ALDO; también se observa un incremento en la actividad del citocromo P-450_{SCC} de animales tratados con respecto a los controles. Es sabido que los pasos regulables en el metabolismo de colesterol a ALDO son principalmente: a) la disponibilidad de colesterol, b) su transformación en P₅ (paso temprano) y c) la transformación de DOC en ALDO. Los últimos pasos, como se ha probado anteriormente (ver sección 4.2.2), son estimulados por ET-1 dado el aumento que provoca el péptido en la actividad de las enzimas responsables de dichas transformaciones, citocromos P-450_{SCC} y P-450_{11 β} .

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en los estudios concernientes al primero de los pasos regulables recién mencionados.

Como se describió en el capítulo 1, la disponibilidad de colesterol, en realidad, es un macroproceso que, a su vez, comprende varias etapas como a) la incorporación de colesterol del medio extracelular al intracelular, b) la distribución del colesterol al reservorio esteroideogénico, c) la esterificación y desesterificación, d) la migración hasta la mitocondria y e) la ubicación en la membrana interna mitocondrial. Los experimentos realizados en este trabajo fueron enfocados para dilucidar principalmente las etapas a) y d).

La problemática de la disponibilidad de colesterol en tejidos esteroideogénicos es más compleja que la simple enumeración de las etapas arriba mencionadas. En efecto, se ha demostrado la existencia de múltiples reservorios de colesterol en distintos tipos de células productoras de esteroides y un tráfico no unidireccional entre ellos [27,290]. El objetivo del trabajo no incluyó la dilucidación de los efectos de ET-1 en estos complejos procesos

sino que se focalizó a encontrar el aporte del péptido al proceso global general.

Por otro lado, el estudio de la regulación de la disponibilidad de colesterol se hace dificultoso tanto en las células esteroideogénicas como en sus mitocondrias, dado que presentan un alto contenido de colesterol que provoca que el citocromo P-450_{SCC} trabaje a saturación, sin el agregado de sustrato exógeno. Paralelamente, en experimentos *in vitro*, existe una alta incorporación no regulable de colesterol a células esteroideogénicas a través del pasaje por la membrana celular.

Estos dos hechos hacen que la incorporación regulable de colesterol a células esteroideogénicas (como la célula de glomerulosa) deba probarse por varias metodologías experimentales, debido a la alta probabilidad de obtener falsos negativos y falsos positivos. Los primeros podrían deberse, por ejemplo, a una alta incorporación no regulable y los segundos podrían ocurrir como consecuencia de un aumento en la movilización del colesterol intracelular que conlleve a una mayor incorporación a fin de reponer los reservorios preexistentes.

Con el objeto de estudiar la posibilidad de que ET-1 estuviera involucrada en la regulación de la disponibilidad de colesterol, para llevar adelante la biosíntesis de ALDO, se realizaron ensayos que consistieron en determinar, por un lado, la incorporación de [³H]-Colesterol y por el otro, los niveles de colesterol endógeno y su distribución subcelular.

Los experimentos de incorporación de [³H]-Colesterol se llevaron a cabo de la manera siguiente: cuartos de adrenales provenientes de animales tratados con solución fisiológica (control) o con ET-1 80 ng.(Kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹, a flujo = 125 µl/min. (condición de máxima producción de ALDO) se incubaron durante 30 minutos a 37°C con suero enriquecido en [³H]-Colesterol, en presencia del inhibidor de la transformación del colesterol, aminoglutetimida (AMG) (experimento *ex vivo*, ver detalles en el capítulo 2). En la figura 4.20 se muestran los resultados obtenidos. La incorporación de [³H]-Colesterol a las glándulas de los animales tratados con ET-1 fue un 84% mayor que los controles, sugiriendo que ET-1 podría estar regulando este proceso a través de un incremento en el número de receptores a lipoproteínas.

Dado que la acción de ET-1 es sobre la zona glomerulosa, se realizaron ensayos similares al recién descrito pero esta vez se analizó la incorporación de [³H]-Colesterol en ambas zonas de la corteza adrenal. Mientras ET-1 provoca un incremento de 1.59 veces en el contenido de [³H]-Colesterol en la zona glomerulosa, no se observa diferencia significativa con respecto al tratamiento control, en el [³H]-Colesterol incorporado en zona fasciculata adrenal.

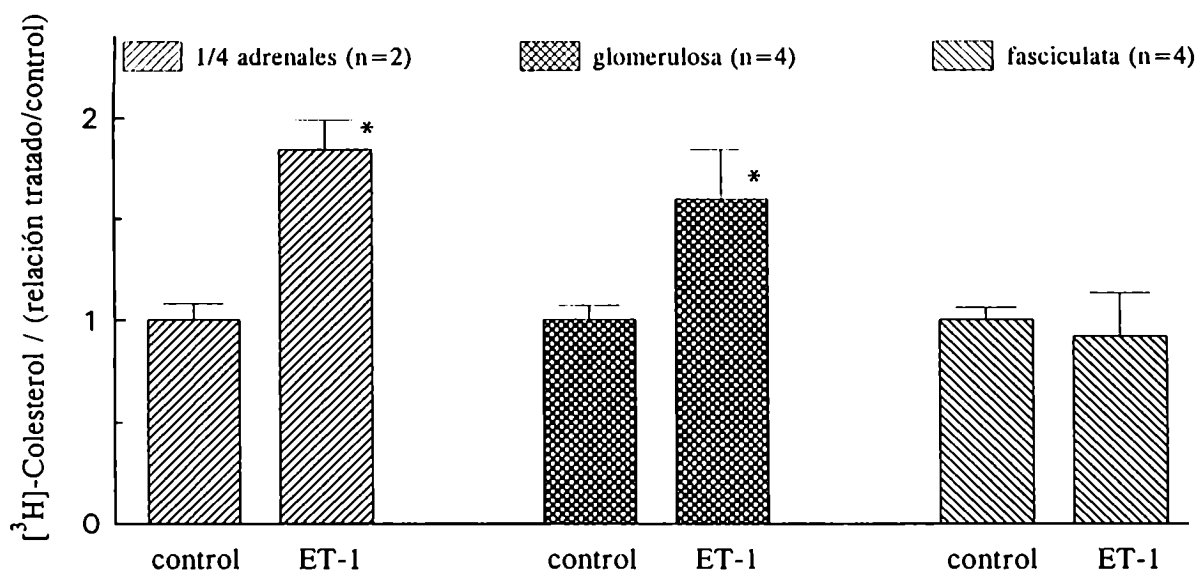


Figura 4.20: Efecto de ET-1 sobre la incorporación de $[^3\text{H}]$ -Colesterol

Se determinaron las dpm de $[^3\text{H}]$ -Colesterol incorporadas a cuartos de adrenales y a zona glomerulosa y fasciculata por separado, provenientes de animales infundidos con ET-1. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de la determinación de la radioactividad asociada al tejido. n=número de experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

Por otro lado, se llevaron a cabo infusiones que consistieron en co-administrar durante los primeros cuatro minutos del tratamiento con ET-1, suero enriquecido en [³H]-Colesterol (experimento *in vivo*, ver detalles en el capítulo 2). Los resultados de estos experimentos *in vivo* también mostraron un aumento en la radioactividad asociada específicamente a la cápsula adrenal, siendo la relación tratado/control igual a 1.94 ± 0.38 .

De acuerdo con los resultados aquí presentados, ET-1 provocaría una mayor incorporación de colesterol unido a lipoproteínas, en células de glomerulosa. Con el objeto de confirmar estas observaciones, se llevó a cabo un abordaje experimental más fisiológico, que además tiene la ventaja de eliminar posibles artefactos producidos por variación de la Ae del [³H]-Colesterol. El mismo consistió en determinar, directamente, el contenido de colesterol endógeno en sendas zonas de la corteza adrenal de animales infundidos. La determinación del colesterol endógeno se realizó utilizando un método de cuantificación colorimétrico. La puesta a punto de la técnica se detalla en el capítulo 2. En la tabla 4.12 se presentan los resultados obtenidos a partir de esos experimentos. El contenido total de colesterol presente en la zona glomerulosa proveniente de animales control fue 88 ± 22 ($\mu\text{g}/\text{cáps.}$), distribuido en 53% como colesterol libre y 46% como ester de colesterol. ET-1 incrementó 1.92 ± 0.22 veces el nivel de colesterol presente en la cápsula adrenal, ese aumento se observa tanto en el contenido de colesterol libre (tratado/control = 1.50 ± 0.14) como en el esterificado (tratado/control = 1.62 ± 0.41). Estos resultados apoyan también la hipótesis de que ET-1 podría estar induciendo una mayor entrada de colesterol a la célula de glomerulosa.

Tabla 4.12: Efecto de ET-1 sobre el contenido de colesterol

homeogenato	colesterol total	colesterol libre	éster de colesterol
	relación tratado/control		
glomerulosa	$1.92 \pm 0.22^*$	$1.50 \pm 0.14^*$	1.62 ± 0.41
fasciculata	1.30 ± 0.16	1.07 ± 0.15	n.d.

Los animales se infundieron con ET-1 de acuerdo con lo descrito en el capítulo 2. Finalizadas las infusiones se extrajeron cápsula y core adrenal, sendas zonas se homogeneizaron y a partir de una fracción de homogenato se determinó colesterol empleando un método colorimétrico. Los resultados corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$, siendo X la relación tratado/control de 3 experimentos realizados por duplicado. n.d.=no determinado. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

El contenido de colesterol presente en la zona fasciculata es 107 ± 24 ($\mu\text{g}/\text{core}$), y se encuentra distribuido como colesterol libre 72% y como éster de colesterol 28%. La infusión de ET-1 produjo un incremento mucho menor en esta zona de la adrenal que en zona glomerulosa, siendo la relación tratado/control = 1.30 ± 0.16 . Este incremento observado, podría ser atribuible a una contaminación del "core" adrenal por células de glomerulosa.

A fin de determinar la especificidad tisular del efecto de ET-1 sobre la incorporación de colesterol a las células, se realizaron ensayos que consistieron en medir el contenido endógeno de colesterol en tejidos blancos y no blancos de ET-1, en particular en testículo, que junto con la glándula adrenal son los principales productores de esteroides en el macho. La figura 4.21 muestra las relaciones tratado/control calculadas a partir del nivel de colesterol determinado en los diferentes órganos, provenientes de animales infundidos con ET-1 $80 \text{ ng} \cdot (\text{Kg de peso corporal})^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$ a flujo = $125 \mu\text{l}/\text{min}$.

ET-1 tampoco modificó el contenido de colesterol en los otros tejidos estudiados (*i.e.* hígado, cerebro, riñón, bazo y testículo). Sólo en el caso particular de pulmón, ET-1 provocó un incremento de 1.48 ± 0.02 veces en el contenido de colesterol endógeno.

Por otro lado, el único tejido principalmente esteroideogénico regulable por ET-1 parecería ser la zona glomerulosa adrenal. La especificidad de la acción de ET-1 sobre el incremento del contenido de colesterol en zona glomerulosa sugiere que dicho efecto podría estar relacionado directamente con la mayor producción de ALDO.

A fin de considerar esta posibilidad se estudió el efecto de ET-1 sobre la distribución subcelular del colesterol presente en la glándula adrenal. La tabla 4.13 muestra los niveles de colesterol total determinados en tres experimentos independientes realizados por duplicado. Dado que en valores absolutos la cantidad de colesterol medida resultó ser distinta entre los experimentos, se decidió detallarlos por separado. Las relaciones tratado/control calculadas a partir de cada ensayo se promediaron y se encuentran detalladas al pie de la tabla. El incremento del contenido de colesterol total en la fracción mitocondrial de adrenales provenientes de animales tratados con ET-1, es de 1.67 veces, mientras que expresando este resultado por unidad enzimática de SDH (proteína marcadora de esa fracción subcelular), el incremento de colesterol producido por ET-1 es de 1.87 veces.

Estos estudios se completaron con experimentos en los cuales se analizó el efecto de ET-1 en la distribución subcelular de [^3H]-Colesterol previamente incorporado a células de glomerulosa. La tabla 4.14 muestra los porcentajes de distribución en las fracciones enriquecidas en núcleos, mitocondrias y citoplasma. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes realizados por duplicado. Cabe aclarar que la distribución

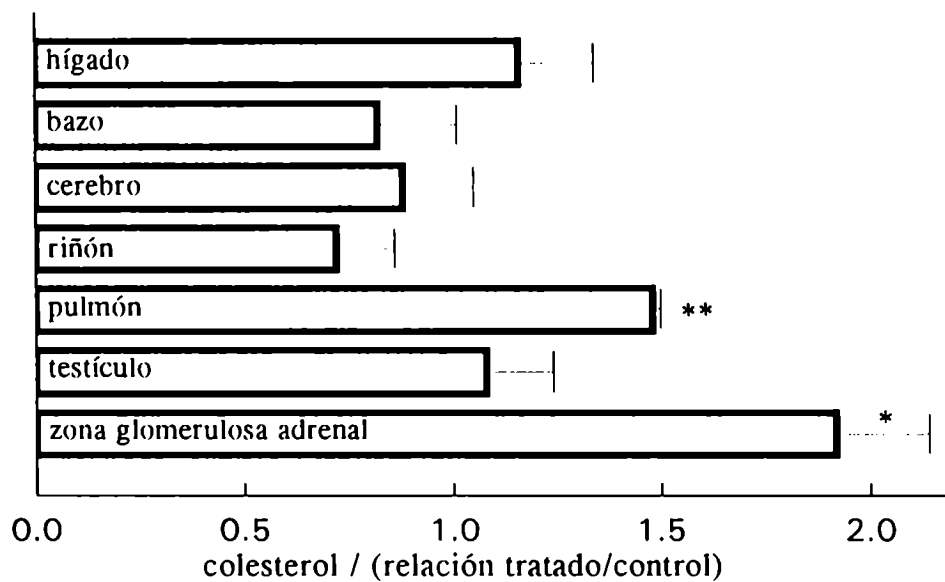


Figura 4.21: Efecto de ET-1 sobre el contenido de colesterol en diferentes tejidos
Se determinó el contenido de colesterol endógeno en diferentes órganos provenientes de animales infundidos con ET-1. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X las relaciones tratado/control calculadas a partir de los niveles de colesterol/mg de prot. determinados, de 3 experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$ y **: $p < 0.001$, con respecto al control.

Tabla 4.13: Colesterol en mitocondrias

		colesterol en homogenato	colesterol en mitocondrias	
		(μg)	(μg)	($\mu\text{g} / \text{U.E.SDH}$)
exp. 1	control	115	90	2.39
	ET-1	344	140	3.27
exp. 2	control	393	98	0.31
	ET-1	879	249	0.85
exp. 3	control	506	247	1.36
	ET-1	1075	228	2.04
relación tratado/control		$2.45 \pm 0.27^*$	1.67 ± 0.47	$1.87 \pm 0.44^{**}$

Los animales se infundieron con ET-1 de acuerdo con lo descrito en el capítulo 2. Finalizadas las infusiones se extrajeron las glándulas adrenales, se homogeneizaron y se realizó un fraccionamiento subcelular. Se determinó colesterol en homogenato y fracción mitocondrial, empleando un método colorimétrico. Los resultados corresponden a 3 experimentos. *: $p < 0.02$ y **: $p < 0.05$, con respecto al control.

subcelular de colesterol endógeno, determinada en adrenales no estimuladas, arrojó los siguientes porcentajes: fracción enriquecida en núcleos 55.4%, fracción mitocondrial 28.6% y sobrenadante postmitocondrial 16%. De acuerdo con los porcentajes de distribución observados en la tabla, sólo en dos de los tres experimentos presentados, la distribución del [^3H]-Colesterol es equivalente a la determinada por el método colorimétrico (medición del contenido de colesterol endógeno).

Las relaciones tratado/control calculadas a partir de cada ensayo se promediaron; como puede observarse en la tabla sólo en la fracción mitocondrial ET-1 provoca un ligero pero significativo incremento (20%) del contenido de [^3H]-Colesterol.

De acuerdo con estos resultados, el aumento en la biosíntesis de P_5 , provocado por ET-1, podría deberse a una acción de dicho péptido sobre la incorporación y transporte del sustrato colesterol hacia la mitocondria.

Otros investigadores [279] observaron en cortes histológicos de zona glomerulosa proveniente de ratas tratadas en forma crónica con ET-1, que dicho tejido presentaba un bajo contenido de gotas lipídicas (reservorios de colesterol esterificado) con respecto a animales controles, sugiriendo que ET-1 estimularía la hidrólisis de los ésteres de colesterol y la subsecuente traslocación del colesterol libre a la mitocondria. Los resultados aquí

Tabla 4.14: Distribución subcelular de [³H]-Colesterol

		colesterol / $\left(100 \frac{\text{dpm}_{\text{fracción}}}{\text{dpm}_{\text{total}}}\right)$		
		núcleos	mitocondrias	sob. postmitocondrial
exp. 1	control	55.78±0.04	24.64±0.55	19.27±0.30
	ET-1	55.04±0.04	27.88±0.62	17.08±0.24
exp. 2	control	80.46±1.50	11.03±1.41	8.51±0.46
	ET-1	75.84±1.12	14.08±0.73	10.08±0.44
exp. 3	control	59.42±0.71	26.22±2.45	12.40±3.40
	ET-1	55.88±7.70	31.09±5.80	13.04±1.87
relación tratado/control		0.96±0.02	1.20±0.04*	1.03±0.08

Las células se preincubaron con suero enriquecido en [³H]-Colesterol y luego se incubaron con ET-1 de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Finalizadas las incubaciones se realizó un fraccionamiento subcelular y se determinó la radioactividad asociada a cada fracción. Los valores corresponden a 3 experimentos independientes. *: $p < 0.05$ con respecto a núcleos, (ANOVA).

presentados apoyarían esta hipótesis.

Receptores involucrados en la incorporación de colesterol: Una vez probado mediante varios tipos de metodologías el efecto de ET-1 sobre la incorporación de colesterol a la zona glomerulosa adrenal, se llevaron a cabo experimentos a fin de determinar qué población de receptores está involucrada en la acción del péptido. Para tal fin se realizaron infusiones con ET-1, en presencia o ausencia del antagonista de receptores ET_A (BQ-123), y además con S_{6b}. Finalizadas las infusiones, las cápsulas adrenales se incubaron durante 30 min. a 37°C con suero enriquecido en [³H]-Colesterol, en presencia de AMG, analizándose luego la radioactividad asociada al tejido, para cada tipo de condición. La tabla 4.15 muestra la actividad medida. ET-1 provocó un aumento del 68% en el contenido de [³H]-Colesterol presente en el tejido. Dicho incremento no fue modificado por la presencia de BQ-123, siendo el porcentaje de estimulación obtenido igual a 64%. BQ-123 no produjo ningún efecto sobre la incorporación basal de [³H]-Colesterol, (relación tratado/control = 0.82). Por otra parte, S_{6b} también incrementó el nivel de [³H]-Colesterol aunque en menor grado que ET-1, siendo el porcentaje de estimulación

producido igual a 22%.

Tabla 4.15: Receptores involucrados en la incorporación de [³H]-Colesterol

tratamiento	[³ H]-Colesterol / (dpm/cápsula)	
control	6370±449	(5)
BQ-123	5237±575	(4)
ET-1	10696±454*	(3)
ET-1 + BQ-123	10443±675**	(3)
S ₆ b	7756±248***	(3)

Los animales se infundieron con S₆b o ET-1 80 ng.(kg. de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ en presencia o ausencia de BQ-123 200 ng.(kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ de acuerdo con lo descrito en el capítulo 2. Luego se extrajo la cápsula adrenal y se incubó con suero enriquecido en [³H]-Colesterol. Se determinó la radioactividad asociada al tejido. Los resultados corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X dpm/cápsula. (n)=número de animales ensayados. *p<0.001 con respecto al control, **p<0.01 con respecto al tratamiento con BQ-123 y ***p<0.05 con respecto al control, (ANOVA).

Estos resultados indican que ET-1 produce un aumento en la incorporación de colesterol a las células mediante la interacción con los receptores ET_B, los mismos involucrados en la estimulación de la producción de ALDO. De esta manera, la acción estimuladora de la aldosteronogénesis que ejerce ET-1 sería a través de la regulación de: a) la entrada del sustrato colesterol a la célula de glomerulosa, b) la distribución subcelular del esterol favoreciendo la incorporación del mismo a la mitocondria, c) la velocidad de la transformación colesterol a P₅ (paso temprano) y d) la velocidad de transformación de DOC en ALDO (paso tardío).

4.3 Efecto de ET sobre la Aldosteronogénesis Mediada por ACTH

De acuerdo con lo mencionado en el capítulo 1, la respuesta biológica de un sistema celular es la resultante de la actividad de una compleja red de mediadores intracelulares que interaccionan entre sí a fin de regular finamente dicha respuesta.

Se ha demostrado en este trabajo que la acción estimuladora de la esteroidogénesis

provocada por ACTH, a través de la activación de la adenilciclase, es modulada por la actividad de otra(s) quinasa(s) (ver capítulo 3). Por otro lado, se demostró que ET-1 activa la producción de ALDO a través de la interacción con la población de receptores ET_B. Estos receptores estarían relacionados en forma directa o indirecta con el aumento del flujo de Ca⁺⁺ provocado por el péptido.

Tomando en cuenta estas dos observaciones se decidió estudiar el efecto de ET-1 sobre la esteroidogénesis mediada por ACTH. Se incubaron células de glomerulosa con diferentes concentraciones de ACTH, en presencia o ausencia de ET 10⁻⁹ M. La figura 4.22 muestra los resultados de dichas estimulaciones. El contenido basal de ALDO fue 0.93±0.07 ng/10⁵ cél. ACTH estimuló la producción de ALDO de manera dosis-dependiente, alcanzando un grado de estimulación igual a 8.2 para la concentración 10⁻⁹ M. Por su parte ET-1 también estimuló la aldosteronogénesis, aunque el efecto de este péptido es significativamente menor que el de ACTH (relación tratado/control = 1.44). Sin embargo, la presencia de ET-1 potenció el efecto de ACTH para todas las concentraciones ensayadas, siendo el porcentaje de potenciación obtenido a dosis máximas de ET-1 y ACTH igual al 63% (ver % de potenciación en la parte superior de la figura 4.22).

El efecto potenciador de ET-1 ha sido también descrito por otros investigadores, en cultivo de células de glomerulosa bovinas [286,281], dichas observaciones también mostraron que ET-1 potencia la producción de ALDO mediada por A II [286,291].

Teniendo en cuenta que ET-1 estimula la entrada de Ca⁺⁺ y colesterol a la célula y también la movilización intracelular del esterol, los resultados aquí presentados sugieren que ET-1 podría potenciar la producción de ALDO mediada por ACTH a través de ambos eventos. De todos modos, el estudio del mecanismo de potenciación se hace difícil, dado que cualquiera de los agentes utilizados como bloqueantes de los diferentes caminos de transducción de señales (*e.g.* H₇, St, verapamil, indometacina, etc.) tienen efecto *per se* sobre la producción de ALDO mediada por ACTH.

A fin de corroborar los resultados de los ensayos *in vitro*, se llevaron a cabo infusiones con ACTH en presencia o ausencia de ET-1. En la tabla 4.16 se muestran los resultados obtenidos. El contenido basal de ALDO citosólica fue 18.14±2.22 ng/cápsula. ET-1 80 ng.(kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹. y ACTH 280 ng.(kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹. provocaron un aumento de los niveles de ALDO, siendo las relaciones tratado/control determinadas para cada condición igual a 1.75 y 1.67, respectivamente. Sorprendentemente, cuando se co-administró ET-1 y ACTH juntos, no se observó ninguna diferencia con respecto al estímulo producido por cada uno de los péptidos por separado (relación

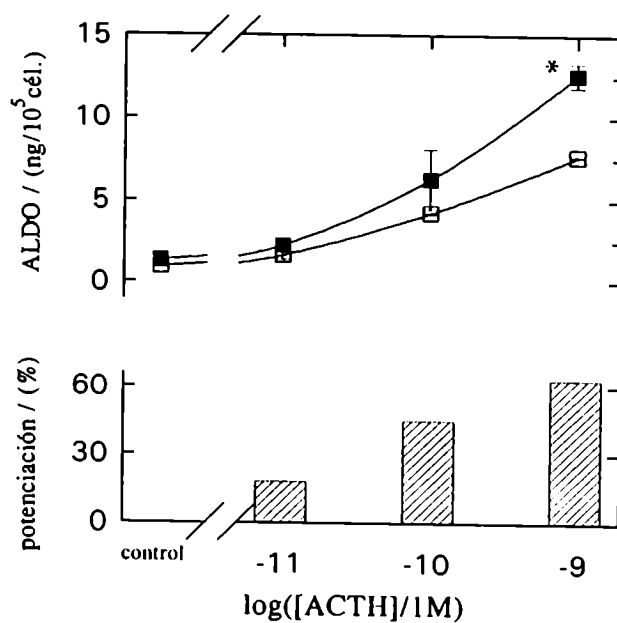


Figura 4.22: Efecto de ET-1 sobre la producción de ALDO mediada por ACTH 10^5 cél. se incubaron durante 90 min. a 37°C con concentraciones crecientes de ACTH, en presencia o ausencia de ET-1 10^{-9} M. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm \text{SE}$ de 1 experimento representativo de 3 (realizados por duplicado), siendo X los ng de ALDO/ 10^5 cél. □: sin ET-1 ■: con ET-1. *: $p < 0.01$ con respecto al tratamiento sin ET-1.

tratado/control = 1.83). De esta manera el efecto potenciador de ET-1, observado tanto en células dispersas (este trabajo) como en cultivos celulares [291,281] no pudo ser reproducido en los estudios *in vivo*.

Hinson *et al.* demostraron que la perfusión de ACTH por arteria adrenal provoca la liberación de ET, sugiriendo que las células endoteliales presentes en la glándula son blanco de la acción de ACTH [292]. Tomando en cuenta esta evidencia, el contenido de ALDO citosólica obtenido en adrenales provenientes de animales infundidos con ACTH sería el resultante de la acción de ACTH *per se* más la mediada por ET producida localmente. Así, el efecto potenciador de ET-1 puede no evidenciarse en los experimentos *in vivo* debido a la presencia del péptido endógeno.

Tabla 4.16: Efecto de ET-1 sobre la producción de ALDO mediada por ACTH (*in vivo*)

Tratamiento	ALDO / (ng/cáps.)
Control	18.14±2.22 (4)
ET-1	31.73±4.28 (3)
ACTH	30.27±6.41 (4)
ET-1+ACTH	33.26±6.40 (3)

Los animales se infundieron con ET-1 80 ng.(kg de peso corporal)⁻¹.min⁻¹ y/o ACTH 280 ng.(kg de peso corporal)⁻¹. min⁻¹, de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 2. Se determinó el contenido citosólico de ALDO. Los valores corresponden a $\bar{X} \pm SE$, siendo X los ng de ALDO/cápsula. Los valores entre paréntesis indican el número de animales ensayados.

4.4 Discusión

La administración de ET-1 a ratas demostró que este péptido es capaz de provocar marcados efectos tanto en la función vascular como en la función endócrina. Los efectos vasculares se visualizan por una ligera y transiente disminución de la presión arterial media seguida por un incremento sostenido de la misma. Esta acción vasoconstrictora de ET ha sido reportada por varios investigadores ([166] y sus ref.) y en este trabajo pudo apreciarse tanto en forma directa, en el aumento del hematocrito, como en forma indirecta, en la disminución del volumen urinario que sería consecuencia de un menor flujo sanguíneo renal debido a la vasoconstricción [184].

De acuerdo con el mecanismo de acción propuesto para ET-1 en el sistema muscular vascular, el péptido se uniría principalmente a dos diferentes poblaciones de receptores. La interacción de ET-1 con los receptores del tipo ET_A activaría a PLC provocando un incremento en el contenido de DAG e IP_3 , como consecuencia de ello se liberaría Ca^{++} de los depósitos intracelulares y se activaría PKC, produciendo como resultado final la vasoconstricción [293,166]. En este trabajo se comprobó que el incremento en la presión arterial media es mediado por la interacción del péptido con los receptores ET_A . Además, es sabido que dicha subpoblación de receptores es mayoritaria en ese tipo celular.

Varios péptidos y hormonas movilizadoras del ión Ca^{++} han demostrado ser también activadores de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa [271,272]. De acuerdo con lo observado en este trabajo, ET-1 se encuentra incluido dentro de ese tipo de hormonas, dado que la administración de la misma a ratas o a preparaciones celulares provocó la activación de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa presente en aorta y en glándula adrenal, aunque la actividad de la enzima de aorta resultó ser menos sensible que la enzima de adrenal a la acción del péptido. El aumento de la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ presente en aorta no fue inhibido por BQ-123, sugiriendo la participación de receptores del tipo ET_B en este proceso. Sin embargo, ha sido reportado que las células de músculo liso vascular no contienen receptores ET_B , sino que éstos se hallan en las células endoteliales adyacentes a aquellas [195]. Por otro lado, se ha demostrado que la vasodilatación transiente provocada por ET-1 es mediada por receptores ET_B presentes en el endotelio vascular [270,171]. De acuerdo con estas evidencias y a los resultados aquí presentados se sugiere que la activación de Na^+/K^+ -ATPasa es a nivel endotelial, y que la misma participaría en ese efecto vasodilatador de ET-1.

La relación "activación de Na^+/K^+ -ATPasa-vasodilatación" que se desprende de estas observaciones son apoyadas por los siguientes hechos: primeramente, es bien sabido que la inhibición de la bomba provoca una alteración en el potencial de membrana que conlleva a la entrada de Ca^{++} a las células produciendo así la vasoconstricción (ver capítulo 1). De hecho se han encontrado en sangre de mamíferos compuestos estructural y funcionalmente similares a ouabaína que producen vasoconstricción y presentan efectos natriuréticos [110]. Por otro lado, trabajos recientes del grupo del Dr. C.E. Gómez-Sánchez demostraron que varias etapas de hipertensión experimental en ratas son abolidas o significativamente disminuidas por la administración de anticuerpos monoclonales contra ouabaína (comunicación personal Dr. C.E. Gómez-Sánchez).

Con respecto a las funciones endócrinas de ET, se demostró la existencia de dos sub-

poblaciones de receptores a ET-1 en células de la zona glomerulosa de adrenal de rata. De acuerdo con el análisis de las curvas de desplazamiento obtenidas, los receptores ET_A se encuentran en mayor proporción que los receptores ET_B, en esta zona de la adrenal. Resultados similares fueron reportados por otros autores en cultivos de células de glomerulosa de ternero [191,192].

ET-1 demostró ser un factor estimulador de la producción de ALDO. Si bien el efecto del péptido observado en preparaciones celulares es menor al provocado por otros estimuladores, la acción aldosteronogénica que ET-1 ejerce cuando es administrada al animal entero adquiere relevancia fisiológica, dado que el máximo grado de estimulación provocado por este péptido es similar o ligeramente superior al mediado por los otros estimuladores clásicos.

Los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que ET-1 estimula la biosíntesis del esteroide mediante una acción directa sobre las células de glomerulosa y a través de receptores específicos.

Una hipótesis alternativa podría atribuir el incremento en el contenido plasmático y/o la acumulación de ALDO en la glándula adrenal, a la reducción del flujo sanguíneo provocado por ET-1. Sin embargo, esta posibilidad quedaría descartada por las diferencias existentes entre las relaciones dosis-respuesta en el cambio en la presión arterial media o el hematocrito y el contenido citosólico de ALDO, siendo mayor el incremento provocado por el péptido en el contenido del esteroide que en el hematocrito. Por otro lado, dosis altas de ET-1 aumentan el hematocrito o la presión arterial media, mientras que disminuyen el contenido de ALDO citosólica (debido probablemente a que tal disminución del flujo sanguíneo impide el acceso de ET-1 al sitio receptor).

La medición de ALDO citosólica ha resultado ser un parámetro útil en el estudio de la acción de ET-1 sobre la respuesta adrenal *in vivo*, dado que existe una muy buena correlación entre las curvas dosis-respuesta para la conversión de DOC en ALDO, el contenido de ALDO citosólica y el nivel de ALDO plasmática, sugiriendo que el aumento del nivel de ALDO citosólica luego de la infusión con ET-1 es una consecuencia directa de un incremento de la síntesis mitocondrial del esteroide.

La acción de ET-1 sobre la biosíntesis de ALDO no fue modificada por la presencia de enalapril (inhibidor de la enzima convertidora de A I en A II) indicando que el péptido ejerce una acción directa sobre adrenal y no a través del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, ha sido reportado que ET provoca un aumento en la actividad de renina plasmática en perros [284]. De todas formas, los resultados aquí presentados no descartan

la posibilidad de que ET ejerza alguna acción sobre la actividad del sistema renina-angiotensina intraadrenal.

Las acciones de ET-1 que conducen al aumento en la biosíntesis de ALDO son producidas, principalmente, por la interacción del péptido con los receptores ET_B. Este resultado es avalado por estudios realizados por otros investigadores en otras especies [191,192].

De acuerdo con las observaciones que se desprenden de este trabajo, la activación de los receptores ET_B produce un aumento en el influjo de Ca⁺⁺ que sólo es bloqueado en forma parcial por verapamil (51% de inhibición), sugiriendo que tanto los canales de Ca⁺⁺ del tipo L (sensibles a verapamil) como otros canales (insensibles a la droga), probablemente los operado por receptor, participarían de la entrada del ión mediada por ET-1. Esta hipótesis es avalada por los estudios de Iijima *et al.* [294] quienes observaron que ET-1 provoca un aumento inicial y transiente en la [Ca⁺⁺]_i (mediado por IP₃), que sería independiente de la concentración extracelular de Ca⁺⁺, y luego un aumento de la [Ca⁺⁺]_i sostenido, que sería provocado, en parte, por la apertura de canales voltaje-dependientes y operados por receptor.

Finalmente, verapamil inhibe en una proporción similar la estimulación de la producción de ALDO provocada por ET-1 (65% de inhibición), sugiriendo así que la entrada de Ca⁺⁺ formaría parte del mecanismo de transducción de la señal de ET-1 sobre esta respuesta adrenal.

Por otra parte, la función de los receptores ET_A en adrenal no parece ser muy clara, dado que la interacción de ET-1 con dichos receptores provoca un incremento en el contenido de DAG. Sin embargo, en este trabajo no se encontró una relación directa entre dicho incremento y la activación de la producción de ALDO mediada por el péptido. Además, la activación de quinasas sensibles a H₇ (en particular PKC), no sería un factor importante en la producción de ALDO mediada por ET-1, ya que la presencia de este inhibidor de quinasas no produjo modificación alguna en la acción del péptido. Cabe aclarar que la activación de la PKC induce la expresión de genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular [91]. Además ha sido descripto que ET produce mitogénesis en diversos tipos celulares [183,172,293]. Teniendo en cuenta ambos eventos probablemente los receptores ET_A participarían de esta función de ET.

La acción aldosteronogénica de ET-1 se ejerce a través de la regulación de diferentes puntos del camino biosintético. En este trabajo se demostró que ET-1 provoca un aumento de la incorporación de colesterol a la célula de glomerulosa y estimula la distribución subcelular del esterol favoreciendo el pasaje del mismo a la mitocondria. Estos eventos

mediarían la acción aldosteronogénica de ET-1.

Es bien sabido que ACTH regula el transporte de colesterol desde membrana externa mitocondrial hasta membrana interna a través de la inducción de péptidos (de los cuales ya se han aislado aproximadamente 10) que llevan el esteroide a través del espacio intermembrana (ver [132] y sus ref.). De todos ellos el más relevante fisiológicamente es el péptido SAP ("steroidogenesis activator peptide") aislado por Pedersen y Brownie [133]. ACTH induce la síntesis de SAP y en consecuencia estimula el transporte de colesterol [134]. De acuerdo con estudios realizados por el grupo del Dr. C.E. Gómez-Sánchez ET-1, a diferencia de ACTH, no provoca estimulación en los niveles de SAP. Estos resultados sugieren que ET-1 no estimula el pasaje de colesterol desde membrana externa a membrana interna mitocondriales o que, si lo hace, no sería a través de este mecanismo (comunicación personal del Dr. C.E. Gómez-Sánchez).

Por otro lado, ET-1 estimula tanto el paso temprano como el paso tardío de la producción de esteroides a través de un incremento en la actividad de los citocromos mitocondriales P-450_{SCC} y P-450_{11β}.

Como se mencionó anteriormente ET-1 activa la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa en adrenal, siendo esta estimulación principalmente sobre la enzima presente en zona glomerulosa. De acuerdo con la forma monofásica de la curva de inhibición de Na⁺/K⁺-ATPasa por ouabaína y por el valor del IC₅₀ obtenido de la misma se desprende que la zona glomerulosa adrenal contiene principalmente la isoenzima α. Estos resultados coinciden con los descritos por Hajnoczky *et al.* [47].

La actividad de la bomba dependiente de Na⁺ y K⁺ es también mediada por la interacción del péptido con los receptores ET_B. El mecanismo por el cual diversos agentes estimulan Na⁺/K⁺-ATPasa no es claro. Un trabajo reciente demostró que ET-1 activa la bomba de Na⁺ y K⁺ en aorta de conejo y que dicha activación estaría relacionada con el incremento del intercambio Na⁺-H⁺, mediado por PKC [273]. Sin embargo, resultados propios (no presentados aquí) mostraron que la acción del péptido sobre la actividad Na⁺/K⁺-ATPásica no es modificada por la presencia del inhibidor de quinasas H₇, ni por bloqueantes de otras vías de transducción de señales como verapamil o indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa involucrada en la producción de prostaglandinas), sugiriendo que la acción de ET-1 sobre la actividad de la enzima podría estar relacionada con la entrada de Ca⁺⁺ mediada por la apertura de un canal operado por receptor.

Cabe destacar que la activación de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa mediada por ET-1 no fue igual en todas las cepas de ratas estudiadas. En particular, mostró significati-

vas diferencias en la cepa SS con respecto a las otras cepas consideradas normotensivas. Dado que la actividad Na^+/K^+ -ATPásica está relacionada con los cambios en la presión arterial, surge la posibilidad de que la enzima tenga directa relación con el particular comportamiento de la presión arterial en la cepa SS.

La relación que se pueda establecer entre el aumento en la producción de ALDO y la activación de Na^+/K^+ -ATPasa, mediados por el péptido, parece ser bastante compleja. Los estudios realizados con ouabaína demuestran que existe una concentración del glicósido (10^{-4} M) que provoca la máxima estimulación de la producción de ALDO y a su vez inhibe parcialmente la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ (70%). Sin embargo, cuando la enzima Na^+/K^+ -ATPasa se encuentra totalmente inhibida (ouabaína = 10^{-3} M), la producción de ALDO no es significativamente diferente al tratamiento control. Se ha propuesto que una inhibición parcial de la actividad Na^+/K^+ -ATPásica provocaría un cambio pequeño pero significativo en la relación $[\text{Na}^+/\text{K}^+]$ intracelular, con respecto a la extracelular; este cambio conduciría a una mayor entrada de Ca^{++} y en consecuencia un aumento en la biosíntesis de ALDO [114]. A concentraciones mayores, ouabaína no es capaz de aumentar la producción de ALDO con respecto al tratamiento control. De acuerdo con lo descrito por Braley *et al.* [114], este efecto de ouabaína no es debido a una acción tóxica del glicósido porque puede ser revertido incrementando la concentración de K^+ extracelular, sugiriendo que la inhibición total de la bomba por ouabaína provoca un desbalance iónico tal que reduce la respuesta celular.

Braley *et al.*, [114] proponen que la concentración de K^+ intracelular es importante en la modificación de la respuesta de las células de glomerulosa ante estimuladores que actúan de manera independiente de K^+ , por lo tanto un gran decremento en el K^+ intracelular disminuiría la respuesta esteroideogénica. Los resultados, apoyan esta hipótesis en vista que altas dosis de ouabaína inhiben la producción de ALDO mediada por ACTH.

Sorprendentemente, ET-1 y ouabaína actúan sinérgicamente sobre la biosíntesis de ALDO. La potenciación producida puede ser debida a diversos factores. Por un lado, ambas sustancias aportarían Ca^{++} a la célula a través de mecanismos diferentes, ouabaína a través de la apertura de canales voltaje-dependientes ¹ y ET-1, principalmente por la apertura de canales operados por receptor. Esta conclusión deriva del hecho de que verapamil inhibe tanto la entrada de Ca^{++} como la aldosteronogénesis mediada por ouabaína pero afecta solo parcialmente dichos procesos mediados por ET-1. Por otro lado, ET-1 podría estar atenuando la gran disminución de $[\text{K}^+]$ intracelular y/o el drástico cambio

¹Ouabaína 10^{-3} M inhibe aldosteronogénesis pero incrementa el influjo de Ca^{++} .

en el medio iónico producido por ouabaína, dado que ambas sustancias provocan acciones opuestas sobre la actividad de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ .

Bajo la hipótesis que la activación de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa sea en realidad una señal de terminación para la aldosteronogénesis mediada por ET-1, también puede postularse que ouabaína reduciría dicha señal y por lo tanto la producción de ALDO aumentaría.

Un hecho relevante de la acción de ET-1 es el de potenciar la respuesta aldosteronogénica mediada por ACTH. Estas observaciones son congruentes con los resultados presentados por otros investigadores quienes demostraron que ET-1 potencia la producción de ALDO mediada por esta hormona [281] y también la mediada por A II [286,291] (en adrenal de vaca). Si bien la acción potenciadora de ET-1 ha sido observada en estudios realizados con suspensiones celulares o cultivos primarios (en este trabajo y en los reportados por otros autores), los estudios *in vivo* presentados aquí no arrojaron los mismos resultados. Una posibilidad es que la infusión de ACTH esté provocando niveles de ALDO ya potenciados. Esta hipótesis está avalada por lo reportado por Hinson *et al.* quienes demostraron que la perfusión de glándula adrenal con ACTH produce la liberación de ET [292]. Además, es bien sabido que la glándula adrenal contiene una alta proporción de tejido endotelial y sumado a eso, se le ha adjudicado a ET una función parácrina más que la de una hormona circulante, dado que las cantidades en circulación de la misma son pequeñas [295]. Todo esto en su conjunto lleva a suponer que la ausencia de potenciación observada en los experimentos *in vivo* son debidas a un incremento en la liberación de ET endógena provocada por ACTH.

El mecanismo de la potenciación de la acción de ACTH sobre la producción de ALDO, mediada por ET-1 podría involucrar: a) la entrada de Ca^{++} y b) la entrada y distribución de colesterol.

Por otro lado, como ouabaína inhibe ACTH, resulta interesante que ET-1, que ejerce un efecto opuesto al del glicósido (activa la enzima Na^+/K^+ -ATPasa), potencie la acción de ACTH, quizás otorgando al medio intracelular una relación Na^+/K^+ más favorable para la estimulación de la biosíntesis de ALDO.

La acción de ET-1 sobre glándula adrenal podría ser causada por una mayor secreción del péptido a nivel parácrino que en condiciones fisiológicas actuaría principalmente como modulador positivo de la acción de otros agentes estimuladores de la aldosteronogénesis. Sin embargo, ante determinadas condiciones patológicas que provocan un incremento en los niveles del péptido circulante, la función de ET adquiriría un mayor significado

sistémico. En el caso particular de la hipertensión maligna, la misma presenta, en gran número de casos, una elevada producción de ALDO [296]. Durante el tratamiento de esta enfermedad, los niveles de ALDO se normalizan mucho después que el sistema renina-angiotensina [296], indicando la existencia de algún otro estimulador que no actúa a través de un incremento de la renina plasmática. Además, en la fase maligna de la hipertensión existen cambios significativos y daños en el endotelio que podrían producir una mayor secreción de ET-1 [170,297]. El rol de ET-1 en potenciar el desorden producido en la hipertensión maligna no se conoce, pero el aumento que provoca en la producción de ALDO podría ser una hipótesis probable a estudiar.

En la figura 4.23 se esquematizan los mecanismos mencionados en esta discusión.

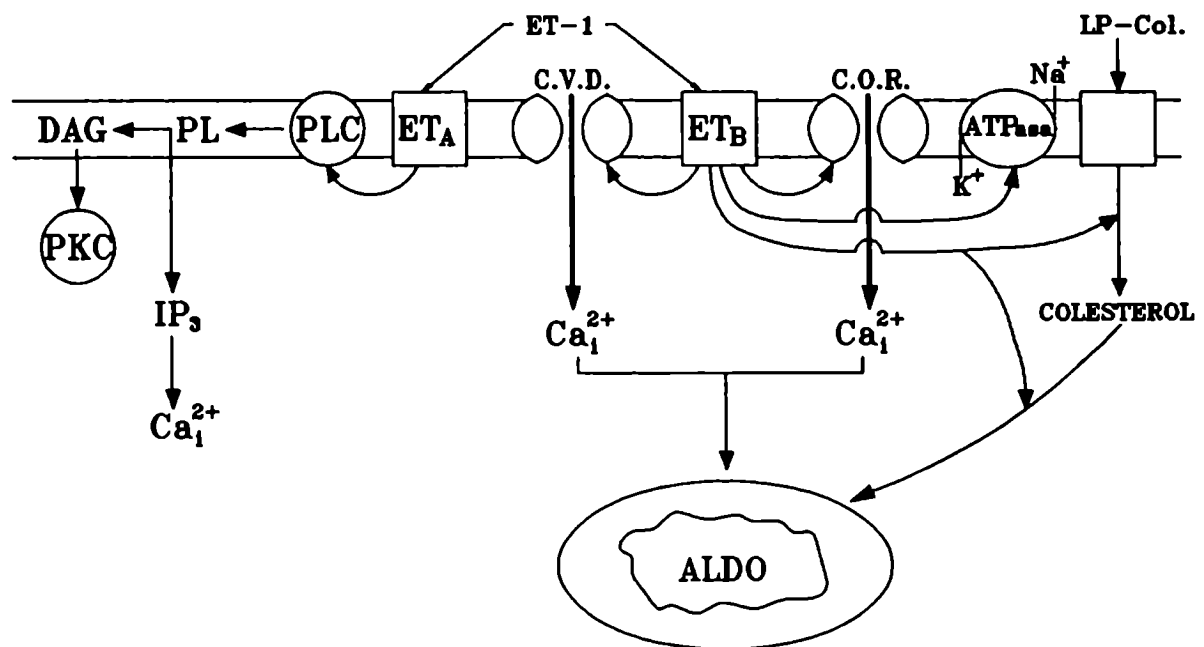


Figura 4.23: Esquema de los mecanismos de acción de ET-1 en adrenal.

Capítulo 5

Conclusiones

El trabajo aquí presentado fue orientado hacia el estudio de la acción y mecanismo de acción de dos factores que estimulan la esteroidogénesis adrenal. Uno de ellos, ACTH, es un conocido activador de la biosíntesis de esteroides y el otro, ET-1, es el agente vasoactivo más potente conocido.

De acuerdo con los resultados de los experimentos realizados en el estudio del mecanismo de acción de ACTH, se concluye que dicho péptido estimula la producción de ALDO mediante la activación de más de una vía de transducción de señales.

Si bien el principal segundo mensajero es el cAMP, en este trabajo se demostró, utilizando como herramienta bajas concentraciones de staurosporina (ver figuras 3.5; 3.6; 3.7; 3.8 y 3.9), que una quinasa diferente a PKA activaría directamente la producción de ALDO (ver tabla 3.6) y/o modularía positivamente la vía de la adenilciclase (ver figura 3.6 y tabla 3.3) a nivel de la proteína G. De acuerdo con las evidencias presentadas, la putativa quinasa sería PKC (figuras 3.10; 3.12; 3.13 y 3.14).

El uso de altas concentraciones de St permitió concluir que una quinasa, probablemente PKA, medie la activación de PDE en un mecanismo de retroalimentación negativa de la acción de ACTH (tablas 3.4 y 3.5).

Del estudio realizado con el péptido ET-1 se concluye que el mismo es un agente estimulador de la aldosteronogénesis (ver figura 4.4 y tabla 4.3). Por otro lado, ET-1 también actúa como potenciador del estímulo provocado por ACTH (figuras 4.22, 4.16). La acción de ET-1 en adrenal es a través de la regulación de distintos puntos involucrados en la biosíntesis de ALDO. En este trabajo se demostró que ET-1 estimula: a) la incorporación del colesterol exógeno (fig. 4.20 y tabla 4.12); b) la traslocación del mismo hasta la mitocondria (tablas 4.13, 4.14) y: c) la activación de los citocromos mitocondriales P-450_{SCC} y P-450_{11 β} (tabla 4.4).

ET-1 tiene dos subpoblaciones de receptores en zona glomerulosa de adrenal de rata (figura 4.3), denominadas ET_A y ET_B.

De acuerdo con experimentos realizados a fin de dilucidar el mecanismo de acción de ET-1 se concluye que el péptido sólo provoca un aumento en la biosíntesis de ALDO luego de su interacción con la subpoblación de receptores ET_B (fig. 4.6), proponiéndose como segundo mensajero el influjo de Ca⁺⁺ (figuras 4.10). Este último se produce por la apertura de canales voltaje-dependiente y operados por receptor (figura 4.11 y tablas 4.7, 4.8).

La interacción de ET-1 con los receptores ET_A de glándula adrenal provoca el aumento en el contenido de DAG (figuras 4.7 y 4.8), el cual podría mediar acciones mitogénicas de

la hormona.

Por otra parte, ET-1 demostró ser un activador de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa presente en zona glomerulosa adrenal (figuras 4.9, 4.13) y en aorta (figura 4.2). Este efecto también resultó ser a través de la activación de los receptores ET_B (fig. 4.14, 4.10). La relación que pudiese existir entre la activación de la bomba dependiente de Na^+ y K^+ y el incremento en la biosíntesis de ALDO requiere de más estudios. Sin embargo, en este trabajo se demostró que ET-1 no sólo revierte la inhibición de la aldosteronogénesis provocada por concentraciones altas de ouabaína, sino que también potencia el efecto estimulador de las concentraciones bajas del glicósido (figura 4.19).

El efecto hipotensor transiente de ET-1, provocado a través de la interacción de la hormona con la subpoblación de receptores ET_B [270], sería mediado por la activación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa en aorta a través de la misma subpoblación de receptores (tabla 4.2). Por otro lado, el efecto hipertensor de ET-1 es producido a través de los receptores ET_A (figuras 4.1 y 4.2).

Finalmente, de los ensayos realizados con los dos estimuladores de la respuesta adrenal (ACTH y ET-1) se puede inferir una relación funcional entre ambos. La acción de ACTH puede ser modulada por ET, cuya secreción a nivel local podría ser a su vez regulada por ACTH. Así, el significado fisiológico que ET puede llegar a tener como estimulador de la respuesta aldosteronogénica radica en el hecho de ser capaz de potenciar el efecto de otros estimuladores. El mecanismo por el cual ET potencia el efecto de ACTH debe ser objeto de mayores estudios.

Bibliografía

- [1] R. M. Berne y M. N. Levy. *Fisiología. Med. Paramericana S.A.*, Buenos Aires, 1987.
- [2] Gómez-Sánchez C.; M. Montgomery; A. Ganguly; O. Holland; E. Gómez-Sánchez; C. Grim y M. Weinberger. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 59:1024, 1984.
- [3] Hall C.; C. Gómez-Sánchez y S. Hungerford. *Hypertension*, 8:317, 1986.
- [4] Cozza E.N.; M.F. Foeking y C.E. Gomez-Sanchez. *J. Steroid Biochem.*, 35:511, 1990.
- [5] Cozza E.; M. Chavarri; M. Foeking y C. Gómez-Sánchez. *Proc. of Soc. Exp. Biol. and Med.*, 203:317, 1993.
- [6] Arnold J. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, 35:64, 1866.
- [7] Orth D.N.; W.J. Kovacs y C.R. De Bold. page 489. Volume The Adrenal Cortex, W.B. Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, Pennsylvania, 1992.
- [8] Müller J. *J. Ster. Biochem. and Mol. Biol.*, 45:153, 1993.
- [9] Crabbe J. *Endocrinology*, 69:673, 1961.
- [10] Toth I.E.; K. Szalay; D. Szabo y J. Pill. *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.*, 37:687, 1990.
- [11] Churchill P.F.; L.R. de Alvare y T. Kimura. *J. Biol. Chem.*, 253:4924, 1978.
- [12] Simpson E.R. y M.R. Waterman. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:427, 1988.

- [13] Hiwatashi A. y Y. Ichikawa. *Biochim. Biophys. Acta*, 580:44, 1979.
- [14] Cozza E.N.; G. Burton; N. Ceballos; C.P. Lantos; M. Harnik y A. Scott. *J. Steroid Biochem.*, 22:665, 1985.
- [15] Yamakita N. ; S. Choju y C.E. Gómez-Sánchez. *Endocrinology*, 129:2361, 1991.
- [16] Lauber M.; S. Sugano y T. Ohnishi. *J. Steroid Biochem.*, 26:693, 1987.
- [17] Ogishima T.; F. Mitani y Y. Ishimura. *J. Biol. Chem.*, 264:10935, 1989.
- [18] John M.E.; M.C. John; E.R. Simpson; et al. *J. Biol. Chem.*, 260:5760, 1985.
- [19] Chua S.C.; P. Szabo; A. Vitek; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7193, 1987.
- [20] Lauber M. y J. Müller. *Archs. Biochem. Biophys.*, 274:109, 1989.
- [21] Nonaka Y.; N. Matsukawa; K. Morohashi; T. Omura; T. Ogihara; H. Teraoka y M. Okamoto. *FEBS Lett.*, 255:21, 1989.
- [22] Matsukawa N.; Y. Nonaka; Z. Ying; J. Higaki; T. Ogihara y M. Okamoto. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 169:245, 1990.
- [23] Quinn S.J. y G.H. Williams. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:409, 1988.
- [24] Lange Y. y B.V. Ramos. *J. Biol. Chem.*, 258:15130, 1983.
- [25] Simpson E.R.; C.R. Jefcoate; A.C. Brownie y G.S. Boyd. *Eur. J. Biochem.*, 28:442, 1972.
- [26] Freeman D.A. *Endocrinology*, 124:2527, 1989.
- [27] Stevens V.L.; T. Xu y D.Lambeth. *Endocrinology*, 130:1557, 1992.
- [28] Vescei P.; D. Lommer; H.G. Steinacker y H.P. Wolff. *Eur. J. Steroids*, 1:91, 1966.
- [29] Vescei P.; D. Lommer; H.G. Steinacker A. Vescei-Görgenyi. *Acta Endocr. (Copenh.)*, 53:24, 1966.
- [30] Müller J. *Endocrinology*, 103:2061, 1978.

- [31] Müller J. *J. Steroid Biochem.*, 13:245, 1980.
- [32] Müller J. *J. Steroid Biochem.*, 13:253, 1980.
- [33] Aguilera G. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 45:147, 1993.
- [34] Aguilera G. y K. Catt. *J. Steroid. Biochem.*, 19:525, 1983.
- [35] Carson M.; C. Leach Harper; A. Baukal; G. Aguilera y K. Catt. *Mol. Endocrinol.*, 1:147, 1987.
- [36] Fakunding J.L.; R. Chow y K.J. Catt. *Endocrinology*, 105:327, 1979.
- [37] Hausdorff W.; G. Aguilera y K. Catt. *Endocrinology*, 118:869, 1986.
- [38] Aguilera G. y K. Catt. *Endocrinology*, 118:112, 1986.
- [39] Foster R.; M. Lobo; H. Rasmussen y E. Marusic. *Endocrinology*, 109:2196, 1981.
- [40] Foster R. y H. Rasmussen. *Am. J. of Physiol.*, 245:E281, 1983.
- [41] Capponi A.; P. Lew; L. Jornot y M. Vallontton. *J. Biol. Chem.*, 259:8863, 1984.
- [42] Kojima I.; K. Kojima; D. Kreutter y H. Rasmussen. *J. Biol. Chem.*, 159:14448, 1984.
- [43] Farese R.; R. Larson; M. Sabir y C. Gómez-Sánchez. *Endocrinology*, 113:1377, 1983.
- [44] Kojima I.; K. Kojima y H. Rasmussen. *J. Biol. Chem.*, 260:4248, 1985.
- [45] Braley L.M.; A.I. Menachery; E.M. Brown y G.H. Williams. *Endocrinology*, 119:1010, 1986.
- [46] Hunyady L.; S. Kayser; E. Kragoe; I. Balla y A. Spät. *Am. J. of Physiol.*, 254:C744, 1988.
- [47] Hajnoczky G.; G. Csordas; L. Hunyady; M.P. Kalapos; T. Balla; P. Enyedi y A. Spät. *Endocrinology*, 130:1637, 1992.
- [48] Catt K.J.; T. Balla; A.J. Baukal; W.P. Hausdorff y G. Aguilera. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol.*, 15:501, 1988.

- [49] Curnow K.M.; M.T. Tusie-Luna; L. Pascoe; R. Natarajan; J.L. Gu; J.L. Nadler y P.C. White. *Mol. Endocrinol.*, 5:1513, 1991.
- [50] Finkel M.; H. Keiser; K. Catt y G. Aguilera. *Clinic. Res.*, 32:484A, 1984.
- [51] Braley L.; A. Menachery; E. Brown y G. Williams. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 123:810, 1984.
- [52] Benovic J.L.; M. Bouvier; M.G. Caron; et al. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4:405, 1988.
- [53] Hausdorff W.O.; M.G. Caron y R.J. Lefkowitz. *FASEB J.*, 4:2881, 1990.
- [54] Hepler J.R. y A.G. Gilman. *Trends in Biol. Sci.*, 17:383, 1992.
- [55] Kahn C.R.; R.J. Smith y W.W. Chin. page 108: Volume Mechanism of action of hormones that act at the cell surface, W.B. Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, Pennsylvania, 1992.
- [56] Casey P.J. y A.G. Gilman. *J. Biol. Chem.*, 263:2577, 1988.
- [57] Langlois D.; J.M. Saez y M. Begcot. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 146:517, 1987.
- [58] Brami B.; I. Vilgrain y E.M. Chambaz. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 50:131, 1987.
- [59] Lombardo A.; M. Laine; N. Defaye; N. Monnier; C. Guidicelli y E. Chambaz. *Biochim. et Biophys. Acta*, 863:71, 1986.
- [60] F. F. Bolander. *Molecular Endocrinology*. Academic Press Inc., New York, 1989.
- [61] Privalle C.T.; J.F. Crivello y C.R. Jefcoate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:702, 1983.
- [62] DuBois R.N.; E.R. Simpson; R.E. Kramer y M.R. Waterman. *J. Biol. Chem.*, 256:7000, 1981.
- [63] Kramer R.E.; E.R. Simpson y M.R. Waterman. *J. Biol. Chem.*, 258:3000, 1983.
- [64] Funkenstein B.; J.L. McCarthy; K.M. Dus; E.R. Simpson y M.R. Waterman. *J. Biol. Chem.*, 258:9398, 1983.

- [65] Zuber M.X.; E.R. Simpson; P. Hall y M.R. Waterman. *J. Biol. Chem.*, 260:1842, 1985.
- [66] Kramer R.E.; C.M. Anderson; J.A. Peterson; E.R. Simpson y M.R. Waterman. *J. Biol. Chem.*, 257:14921, 1982.
- [67] Liscovitch M. *Trends in Biol. Sciences*, 17:393, 1992.
- [68] Volpi M.; P. NaccacheLauber; T. Molski; J. Shefcyk; C. Huang; M. Marsh; J. Munoz; E.Becker y R. Sha'afi. *Proc. Natl. Acad. Scie.*, 82:2708, 1985.
- [69] Uhing R.; V. Prpic; H. Jiang y J. Exton. *J. Biol. Chem.*, 261:2140, 1986.
- [70] Majerus P.W.; T.M. Connolly; V.S. Bansal; R.C. Inhorn; T.S. Ross et al. *J. Biol. Chem.*, 263:3051, 1988.
- [71] Williamson J.R. y J.R. Monck. *Ann. Rev. Physiol.*, 51:107, 1989.
- [72] Hokin L.E. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:205, 1985.
- [73] Spat A.; P. Bradford; J. McKinney; R. Rubin y J. Putney. *Nature*, 319:514, 1986.
- [74] Asaoka Y.; S.I. Nakamura; K. Yoshida y Y. Nishizuka. *Trends in Biol. Sci.*, 17:414, 1992.
- [75] Cozza E.N.; M. del C. Vila; M. Acevedo-Duncan; R.V. Farese y C.E. Gómez-Sánchez. *Endocrinology*, 126:2169, 1990.
- [76] Vila M.; G. Milligan; M. Standaert y R. Farese. *Biochemistry*, 29:8735, 1990.
- [77] Ferris C.D. y S. H. Snyder. *Ann. Rev. Physiol.*, 54:469, 1992.
- [78] Fakunding J. y K. Catt. *Endocrinology*, 110:2006, 1982.
- [79] Johnson J. y J. Mills. *Med. Res. Rev.*, 6:341, 1986.
- [80] Fewtrell C. *Ann, Rev. Physiol.*, 55:427, 1993.
- [81] Guillemette G.; T. Balla; A.J. Baukal y K.J. Catt. *J. Biol. Chem.*, 263:4541, 1988.
- [82] Rasmussen H. y P.Q. Barrett. *Physiol. Rev.*, 64:938, 1984.

- [83] Friesen W.O. y G.D. Block. *Am . J. Physiol.*, 246:R847, 1984.
- [84] Kojima I.; H. Shibata y E. Ogata. *J. Biol. Chem.*, 262:4557, 1987.
- [85] Capponi A.; M. Rossier; E. Davies y M. Valloton. *J. Biol. Chem.*, 263:16113, 1988.
- [86] Rossier M.; C. Python; A. Capponi; W. Schlegel; C. Kwan y M. Vallotton. *Endocrinology*, 132:1035, 1993.
- [87] Kojima I.; H. Shibata y E. Ogata. *FEBS Lett.*, 204:347, 1986.
- [88] Joseph S.K.; K.E. Coll; a. Thomas; R. Rubin y J.R. Williamson. *J. Biol. Chem.*, 260:12508, 1985.
- [89] Bell R. *Cell*, 45:631, 1986.
- [90] Kikawa U.; A. Kishimoto y Y. Nishizuka. *Ann. Rev. Biochem.*, 58:31, 1989.
- [91] Nishizuka Y. *Science*, 233:305, 1986.
- [92] Nishizuka Y. *Nature*, 344:661, 1988.
- [93] Dewald B.; T.G. Payne y M. Baggiolini. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 125:367, 1984.
- [94] Vilgrain I.; G. Defaye y E.M. Chambaz. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 125:554, 1984.
- [95] Limas C.J. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 96:1378, 1980.
- [96] Greene D.A. y S.A. Lattimer. *Diabetes*, 35:242, 1986.
- [97] Katada T.; A.G. Gilman; Y. Watanabe; S. Bauer y K.H. Jakobs. *Eur. J. Biochem.*, 151:431, 1985.
- [98] Nakano S.; P. Carvallo; S. Rocco y G. Aguilera. *Endocrinology*, 126:125, 1990.
- [99] Elliot M.E.; H.M. Jones; S. Tomasko y T.L. Goodfriend. *J. Steroid. Biochem.*, 38:475, 1991.

- [100] Bertorello A.M.; A. Aperia; S.I. Walaas; A.C. Nairn y P. Greengard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11359, 1991.
- [101] Shull G.; A. Schwartz y J. Lingrel. *Nature*, 316:691, 1985.
- [102] Takeyasu K.; V. Lemas y D. Fambrough. *Am J. Physiol.*, 259:C619, 1990.
- [103] J.P. Kraehenbühl y B.C. Rossier Horisberger J.D.; V. Lemas. *Ann. Rev. Physiol.*, 53:565, 1991.
- [104] Boyd G.S. y W.H. Trzeciak. *Am. N.Y. Acad. Sci.*, 212:361, 1973.
- [105] Meuli C. y J. Müller. *J. Steroid Biochem.*, 16:129, 1982.
- [106] Van Dycke R.W. y B.F. Scharschmidt. *J. Biol. Chem.*, 258:12912, 1983.
- [107] Brodie C. y S.R. Sampson. *J. Cell. Physiol.*, 140:131, 1989.
- [108] Bertorello A.M. y A. Aperia. *Am. J. Physiol.*, 256:F370, 1989.
- [109] Szalay K.S. *Acta Endocrinologica*, 68:477, 1969.
- [110] Rueg U.T. *Experientia*, 48:1102, 1992.
- [111] Schwartz Matsui H, y A. *Biochim. et Biophys. Acta*, 151:655, 1968.
- [112] Gruber K.A.; J.M. Whitaker y V.M. Buckalew. *Nature*, 287:743, 1980.
- [113] Kojima J.; S. Yoshihara y E. Ogata. *Life Sci.*, 30:1775, 1982.
- [114] Braley L.M. y S. Williams. *Endocrinology*, 103:1997, 1978.
- [115] Elliot M.E.; N.E. Hadjokas y L. Goodfriend. *Endocrinology*, 118:1469, 1986.
- [116] De Wardener H.E. y G.A. MacGregor. *Hypertension*, 8:658, 1986.
- [117] Bova S.; M.P. Blaustein; J.H. Ludens; D.W. Harris; D.W. DuCharme y J.M. Hamlyn. *Hypertension*, 17:944, 1991.
- [118] Hamlyn J.M.; P.M.P. Blaustein; S. Bova; D.W. DuCharme; D.W. Harris; F. Mandel; W.R. Mathewes y J.H. Ludens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:6259, 1991.

- [119] Harris D.W.; M.A. Clark; J.F. Fisher; J.M. Hamlyn; K.P. Kolbasa; J.H. Ludens y D.W. DuCharme. *Hypertension*, 17:936, 1991.
- [120] Ludens J.H.; M.A. Clark; D.W. DuCharme; D.W. Harris; B.S. Lutzke; F. Mandel; W. R. Mathews; D.M. Suter y J.M. Hamlyn. *Hypertension*, 17:923, 1991.
- [121] Fagoo M.; P. Braquet; J.P. Robin; A. Esanu y T. Godfraind. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 134:1064, 1986.
- [122] Anner B.M.; H.G. Rey; M. Moosmayer; I. Meszoely y G.T. Hauptert. *Am. J. Physiol.*, 258:F144, 1990.
- [123] Pernollet M.G.; R.M. Ali; P. Meyer y M.A. Devynck. *Hypertension*, 4 (Suppl. 6):S382, 1986.
- [124] Gaut M.H.; S. Vasdev; L. Longerich; et al. *Clin. Physiol. Biochem.*, 6:253, 1988.
- [125] Tamura M.; T.T. Lam y T. Inagami. *Biochemistry*, 27:4244, 1988.
- [126] Labella F.S.; J.F. Templeton; V.P. Sashi Kumar y D. Bose. *Trens Pharmacol. Sci.*, 10:11, 1989.
- [127] Seccombe D.W.; M.R. Pudek; W. Nowaczynski y K.H. Humpries. *Clin. Biochem.*, 22:17, 1989.
- [128] Vinge E.; M.T. Erfurth y S. Lundin. *Acta Endocrinologica*, 128:29, 1993.
- [129] Thorner M.O.; M.L. Vance; E. Horvath y K. Kovacs. page 91. Volume The anterior pituitary, W.B. Saunders Company. Haarcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, Pennsylvania, 1992.
- [130] Gwynne J.J. y R.L. Ney. The adrenal cortex. In Ingbar S.H., editor, *Contemporary Endocrinology*, chapter 6, Plenum, N.Y., 1979.
- [131] Loscalzo B.; G. Nistico y P. Preziosi. *Pharmacol. Res. Comm.*, 2:55, 1970.
- [132] Vinson G.P. *J. Endocrinology*, 114:163, 1987.
- [133] Pedersen R.C. y A.C. Brownie. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80:1882, 1983.

- [134] Pedersen R.C. y A.C. Brownie. *Science*, 236:1882, 1987.
- [135] Chayen J.; J.R. Daly; N. Loveridge y L. Bitensky. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 32:33, 1976.
- [136] Gwynne J.J. y R.L. Ney. The adrenal cortex. In Ingbar S.H., editor, *Contemporary Endocrinology*, chapter 5, Plenum, N.Y., 1979.
- [137] Müller J. Monogr. endocr. In Müller J., editor, *Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects.*, chapter 29, Springer Verlag, Berlin, 1988.
- [138] Aguilera G.; K. Fujita y K.J. Catt. *Endocrinology*, 108:522, 1981.
- [139] Lantos C.P.
- [140] Lantos C.P.; M.K. Birmingham y H. Traikov. *Acta Physiol. Latinoam.*, 17:42, 1967.
- [141] Lantos C.P.; V. Dahl; J.R. Cordero Funes y A.F. De Nicola. *Acta Physiol. Latinoam.*, 23:277, 1973.
- [142] De Nicola A.F.; V. Dahl y S. Kaplan. *J. Steroid Biochem.*, 4:205, 1973.
- [143] Gallo-Payet N. y E. Escher. *Endocrinology*, 117:38, 1985.
- [144] Haynes R.C.; S.B. Kority y F.G. Peron. *J. Biol. Chem.*, 234:1421, 1959.
- [145] Shima S.; Y. Kawashima y M. Hirai. *Endocrinology*, 103:1361, 1978.
- [146] Fraser R.; J.J. Brown; A.F. Lever; P.A. Mason y J.I.S. Robertson. *Clin. Sci. (Lond.)*, 56:389, 1979.
- [147] Aguilera G. y K.J. Catt. *Endocrinology*, 104:1046, 1979.
- [148] Tait J.F.; S.A.S. Tait; J.B.G. Bell; P.J. Hyati y B.C. Williams. *J. Endocrinol.*, 87:11, 1980.
- [149] Perchellet J.; G. Shanker y R.K. Sharma. *Science*, 199:311, 1978.
- [150] Farese R.V.; L.F. Fanjul; C.M. de Ruiz Gallareta; J.S. Davis y D.R. Cooper. *Life Sci.*, 41:2631, 1987.

- [151] Bristow A.F.; C. Gleed; J.L. Fauchere; R. Schwyzer y D. Schulster. *Biochem. J.*, 186:599, 1980.
- [152] Igarashi Y. y T. Kimura. *J. Biol. Chem.*, 259:10745, 1984.
- [153] Kimura T. *J. Steroid Biochem.*, 25:711, 1986.
- [154] Hall P.F. *Hormonal proteins and peptides*, page 98. Volume XIII (Corticotropin), Academic Press, Inc., New York, 1987.
- [155] Li Z.G.; D. Park y F.S. Labella. *Endocrinology*, 125:592, 1989.
- [156] Schiffrin E.L.; M. Lis; J. Gutkowska y J. Genest. *Am. J. of Physiol.*, 241:E42, 1981.
- [157] Balla T.; L. Hunyady y A. Spät. *Biochem. Pharmacol.*, 31:1267, 1982.
- [158] Wilson J.X.; G. Aguilera y K.J. Catt. *Endocrinology*, 115:1357, 1984.
- [159] Kojima I. y E. Ogata. *J. Biol. Chem.*, 261:9832, 1986.
- [160] Payet M.D.; N. Gallo-Payet y R.Sauve. *Biophys. J.*, 49:166A, 1986.
- [161] Cozza E.N.; M. del C. Vila; M. Acevedo-Duncan; C.E. Gómez-Sánchez y R.V. Farese. *J. Steroid Biochem.*, 35:343, 1990.
- [162] Widmaier E.P. y P.F. Hall. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 43:181, 1985.
- [163] Ishizuka T.; K. Miura; N. Seigi y Y. Nozawa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155:643, 1988.
- [164] Farese R.V.; T.S. Konda; J.S. Davis; M.L. Standaert; R.J. Pollet y D.R. Cooper. *Science*, 236:586, 1987.
- [165] Emoto T.; K. Kasai; M. Hiraiwa y S.I. Shimoda. *Life Sci.*, 42:2249, 1988.
- [166] Highsmith R.F.; K. Blackburn y D.J. y D.J. Schmidt. *Ann. Rev. Physiol.*, 54:257, 1992.
- [167] Hickey K.A.; G.M. Rubanyi; R.J. Paul y R.F. Highsmith. *Am. J. Physiol.*, 248:C550, 1985.

- [168] Gillespie M.N.; J.O. Owasayo; I.F. McMurtry y R.F. O'Brien. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236:339, 1986.
- [169] O'Brien R.F.; R.J. Robbins y I.F. McMurtry. *J. Cell Physiol.*, 132:263, 1987.
- [170] Y. Tomobe; M. Kobayashi; Y. Mitsui; Y. Yazaki; K. Goto y T. Masaki Yanagisawa M.; H. Kurihara; S. Kimura. *Nature*, 332:411, 1988.
- [171] Inoue A.; M. Yanagisawa; S. Kimura; Y. Kasuya; T. Miyauchi; K. Goto y T. Masaki. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:2863, 1989.
- [172] Simonson M.S.; S. Wann; P. Mene; G. Dubyak; M. Kester; Y. Nakazato; J. Sedor y M. Dunn. *J. Clin. Invest.*, 83:708, 1989.
- [173] Yanagisawa M.; I. Akihiro; T. Ishikawa; Y. Kasuya; S. Kimura; S. Kumagaye; K. Nakajima; T. Watanabe; S. Sakakibara; K. Goto y T. Masaki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:6964, 1988.
- [174] Saida K.; Y. Mitsui y N. Ishida. *J. Biol. Chem.*, 264:14613, 1989.
- [175] Vesely D.L. Endothelins. In University of South Florida Health Sci. Center, editor, *Atrial Natriuretic Hormones*, chapter 14, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1992.
- [176] Nakajima K.; S. Kumagaye; H. Nishio; H. Kuroda; T.X. Watanabe; Y. Kobayashi; H. Tamaoki; T. Kimura y S. Sakakibara. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13(Suppl):S8, 1989.
- [177] Kimura S.; Y. Kasuya; T. Sawamura; O. Shinmi; Y. Sugita; M. Yanagisawa; K. Goto y T. Masaki. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13 (Suppl):S5, 1989.
- [178] Kloog Y.; I. Ambar; M. Sokolovsky; E. Kochva; Z. Wollberg y A. Bdolah. *Science*, 242:268, 1988.
- [179] Vane J.R.; R. Botting y T. Masaki. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13 (Suppl.):S1, 1989.
- [180] Goetz K.L.; B.C. Wang; J.B. Madwed; J.L. Zhu y R.J. Leadley. *Am. J. Physiol.*, 255:R1064, 1988.

- [181] Kurihara H.; M. Yoshizuma; T. Sugiyama; F. Takaku y F. Yanagisawa. *Biochem. Biophys. Res Comm.*, 159:1435, 1989.
- [182] Takasaki C.; N. Tamiya; A. Bdolah; Z. Wollberg y E. Kochva. *Toxicon*, 26:543, 1988.
- [183] Hirata Y.; H. Yoshimi; T. Emori; M. Shichiri y F. Marumo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 160:228, 1989.
- [184] Simonson M.S. y M.J. Dunn. *Ann. Rev. Physiol.*, 55:249, 1993.
- [185] Simonson M.S.; J.A. Wolfe; M. Konieczkowski; J.R. Sedor y M.J. Dunn. *Mol. Endocrinology*, 5:441, 1991.
- [186] Yanagisawa M. y T. Masaki. *Biochem Pharmacol.*, 38:188, 1989.
- [187] Davenport A.P.; D.J. Nunez; J.A. Hall; A.J. Kaumann y M.J. Brown. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, [Suppl. 5] 13:S166, 1989.
- [188] Neuser D.; W. Steinke; G. Theiss y J.P. Stasch. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, [Suppl. 5] 13:S67, 1989.
- [189] Yoshizawa T.; O. Shinmi; A. Giaid; M. Yanagisawa; S. Gibson; S. Kimura; Y. Uchiyama; J. Polak; T. Masaki y I. Kanazawa. *Science*, 247:462, 1990.
- [190] Matsumoto H.; N. Suzuki; H. Onda y M. Fujino. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 164:74, 1989.
- [191] Cozza E.N.; C.E. Gómez-Sánchez; M.F. Foeking y S. Chiou. *J. Clin. Invest.*, 84:1032, 1989.
- [192] Gómez-Sánchez C.E.; E.N. Cozza; M.F. Foeking; S. Choiau y M.W. Ferris. *Hypertension*, 15:744, 1990.
- [193] Cozza E.N. y C.E. Gómez-Sánchez. *Endocrinology*, 127:549, 1990.
- [194] Arai H.; S. Hori; I. Aramori; H. Ohkubo y S. Nakanishi. *Nature*, 348:730, 1991.
- [195] Sakuri T.; M. Yanigasawa; Y. Takuwa; H. Miyazaki; S. Kimura; K. Goto y T. Masaki. *Nature*, 348:732, 1991.

- [196] Sokolovsky M. *Trends in Biol. Sciences*, 16:261, 1991.
- [197] Resink T.J.; T. Scott-Burden y F.R. Bühler. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 157:1360, 1988.
- [198] Sunako M.; Y. Kawahara y K. Kariya. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 160:744, 1989.
- [199] Sugiura M.; T. Inagami; G.M. Hare y J.A. Johns. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 158:170, 1989.
- [200] Mardsen P.A.; N.R. Dantluluri; B.M. Brenner; B.J. Ballermann y T.A. Brock. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 158:86, 1989.
- [201] Ihara M.; K. Noguchi; T. Saeki; T. Fukuroda; S. Tsuchida; S. Kimura; T. Fukami; K. Ishikawa; M. Nishikibe y M. Yano. *Life Sci.*, 50:247, 1992.
- [202] Eguchi S.; Y. Hirata; M. Ihara; M. Yano y F. Marumo. *FEBS Lett.*, 302:243, 1992.
- [203] Takayanagi R.; K. Kitazumi; C. Takasaki; K. Ohnaka; S. Aimoto; K. Tasaka; M. Ohashi y H. Nawata. *FEBS Lett.*, 282:103, 1991.
- [204] Eguchi S.; Y. Hirata; T. Imai y F. Marumo. *Endocrinology*, 132:524, 1993.
- [205] Wayforth H.B. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press Inc., London, U.K., 1980.
- [206] Dexter R.N.; L.M. Fishman; R.L. Ney y G.W. Liddle. *J. of Clin. Endocrinology*, 27:473, 1967.
- [207] Campbell W.B. ; J.M. Schmitz y H.D. Itskovitz. *Endocrinology*, 100:46, 1977.
- [208] Kono T.; F. Ikeda; F. Oseko y H. Imura. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50:40, 1980.
- [209] Vaughan E.D.; M.J. Peach; J.A. Ackerly; B.S. Tsai y A. Larner. *Circ. Res. [Suppl. 1]*, 40:I-94, 1977.
- [210] Campbell W.B.; S.N. Brooks y W.A. Pettinger. *Science*, 184:994, 1974.
- [211] Coleman T.G. ; R.E. Mc. Caa y Mc. Caa. *J. Endocrinology*, 60:421, 1974.

- [212] Cao L. y R.O. Banks. *Life Science*, 46:577, 1990.
- [213] Descalzo J.C. *RETINEC, IPC-RNT- T/I-0590*. Technical Report, Merck-Sharp and Dhome, Argentina, 1987.
- [214] King A.J.; B.M. Brenner y S. Anderson. *A. J. of Physiology*, 256:F1051, 1989.
- [215] Ota K.; T. Kimura; M. Shoji; M. Inoue; K. Sato; M. Ohta; T. Yamamoto; K. Tsunoda; K. Abe y K. Yoshinaga. *Am. J. Physiol.*, 262:E135, 1992.
- [216] Valentin J.P.; D.G. Gardner; E. Wiedemann y M.H. Humphreys. *Hypertension*, 17:864, 1991.
- [217] Hidaka H.; et al. *Biochemistry*, 23:5036, 1984.
- [218] Segal J. *Endocrinology*, 127:17, 1990.
- [219] Kramer R.E.; S. Gallant y A.C. Brownie. *J. Biol. Chem.*, 254:3953, 1979.
- [220] Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, 72:248, 1976.
- [221] Tait J.F.; S.A.S. Tait y R.P.Gould. *J. of Endocrinology*, 55:XXXI, 1972.
- [222] Williams B.C.; J.G. McDougall; P.J. Hyatt; J.B.G. Bell; S.A.S. Tait y J.F. Tait. *J. of Endocrinology*, 81:109, 1974.
- [223] Haning R.; S.A.S. Tait y J.F. Tait. *Endocrinology*, 87:1147, 1970.
- [224] Lobo M.V. y E.T. Marusic. *J. Steroid Biochem.*, 39:323, 1991.
- [225] Müller J. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1:180, 1970.
- [226] Tait J.F. y S.A.S. Tait. *J. Steroid Biochem.*, 7:687, 1976.
- [227] Douglas J.; S. Saltman; C. Williams; P. Bartley; T. Kondo y K. Catt. *Endocrin. Res. Comm.*, 5:173, 1978.
- [228] Cochet C.; C. Souvignet; M. Keramidas y E.M. Chambaz. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 134:1031, 1986.
- [229] Krug E.; H.P. Bremann y A.H. Tashjian. *J. Biol. Chem.*, 261:11852, 1987.

- [230] Hepler J.R.; H.S. Earp y T.K. Harden. *J. Biol. Chem.*, 263:7610, 1988.
- [231] Purdy S.J.; B.J. Whitehouse y D.R.E. Abayasekara. *J. of Endocrinology*, 129:391, 1991.
- [232] Wellen J.J. y T.J. Benraad. *Acta Endocrinol.*, 138 [suppl]:50, 1969.
- [233] Tanaka Y. y S. Ando. *J. of Biochemistry*, 112:117, 1992.
- [234] Bertrand I.B.; J.M. Maixent; G. Christie y L.G. Lelievre. *Biochem et Biophys. Acta*, 1021:145, 1990.
- [235] Courcelles D.C.; P. Roevens y H. Van Belle. *J. Biol. Chem.*, 260:5762, 1985.
- [236] Morris C.; P. Rice y E. Rozengurt. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 140:571, 1989.
- [237] Cozza E.N.; M.C. Vila y C.E. Gomez-Sanchez. *Mol. Cell. Endocrinology*, 70:155, 1990.
- [238] Tamaoki T.; H. Nomoto; I. Takahashi; Y. Kato; M. Morimota y F. Tomita. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 135:397, 1986.
- [239] Beguest M.; D. Langlois; A. Penhoat y J.M. Saez. *Eur. J. Biochem.*, 174:317, 1988.
- [240] Adams J.C. W.J. Gullick. *Biochem. J.*, 257:905, 1989.
- [241] Calvo J.C.; J.P. Radicella y E.H. Charreau. *Biochem J.*, 212:259, 1983.
- [242] Miasiro N.; H. Yamamoto; H. Kanaide y M. Nakamura. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 156:312, 1988.
- [243] Gómez-Sánchez C.E.; M.F. Foecking; M.W. Ferris; M.R. Chavarri; L. Uribe y E.P. Gómez-Sánchez. *Steroids*, 49:581, 1987.
- [244] Munson P.; D. Rodbard y M.L. Jaffe. *IBM PC. Copyright (C)*, NIH Bethesda M.D. USA:20014, 1989.
- [245] Cozza E.N.; C.B. Gonzalez; A. Aragonés; R. Laiza y C.P. Lantos. *Anal. Asoc. Quím. Argentina*, 71:509, 1983.
- [246] Steiner A.L.; C.W. Parker y D.M. Kipnis. *J. Biol. Chem.*, 247:1106, 1972.

- [247] Harper J.F. y G. Brooker. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 1:207, 1975.
- [248] Brooker J.G.; J.F. Harper; W.L. Terasaki y R.D. Moylan. Radioimmunoassay of cyclic amp and cyclic gmp. In G. Brooker; P. Greengard y G.A. Robison, editor, *Advances in Cyclic Nucl. Res.*, chapter 10, Raven Press, 1979.
- [249] Cozza E.N.; M. del C. Vila; C.E. Gómez-Sánchez y R.E. Farese. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 157:585, 1988.
- [250] Farese R.V.; D.E. Barnes; J.S. Davis; M.L. Standaert y R.J. Pollet. *J. Biol. Chemistry*, 259:7094, 1984.
- [251] Avigan J. *J. Biol. Chem.*, 234:787, 1959.
- [252] Philipson K.D. y I.S. Edelman. *Am. J. of Physiol.*, 232:C196, 1977.
- [253] Kimelberg H.K.; et al. *Biochim. et Biophys. Acta*, 282:277, 1972.
- [254] Ames B.N. *Meth. Enzymol.*, 8:115, 1966.
- [255] Pennington R.J. *Biochem. J.*, 80:649, 1961.
- [256] Tait J.F. y Tait S.A.S. *J. of Endocrinology*, 83:1P, 1979.
- [257] Berridge M.J. *Ann. Rev. Biochem.*, 56:159, 1987.
- [258] Bell R.M. *Cell*, 45:631, 1986.
- [259] Hadjian A.J.; M. Culty y E.M. Chambaz. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 123:33, 1984.
- [260] Balla T. y A. Spät. *Biochem. Pharmacol.*, 31:3705, 1982.
- [261] Fakunding J.L. y K.J. Catt. *Endocrinology*, 107:1345, 1980.
- [262] Kigoshi T.; K. Uchida y S. Morimoto. *J. Steroid Biochem.*, 29:277, 1988.
- [263] Rosenthal W.; D. Koesling; U. Rudolph; M. Pallast; M. Yajima y G. Schultz. *Eur. J. Biochem.*, 158:254, 1986.

- [264] Birnbaumer L.; J. Codina; R. Cerione; J. Hildebrandt; T. Sunyer; F. Rojas; M. Caron; R. Lefkowitz y R. Iyengar. Molecular mechanisms of transmembrane signalling. In Cohen P. y M.D. Houslay, editor, *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, chapter 4, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1985.
- [265] K. Yanagibashi. *Endocrinology Jpn.*, 26:227, 1979.
- [266] Cheitlin R.; D.I. Buckley y J. Ramachandran. *J. Biol. Chem.*, 260:5323, 1985.
- [267] Badr K.F.; J.J. Murray; M.D. Breyer; K. Takahashi; T. Inagami y R.C. Harris. *J. Clin. Invest.*, 83:336, 1989.
- [268] Miller W.L.; M.M. Redfield y J.C. Burnett. *J. Clin. Invest.*, 83:317, 1989.
- [269] Hirata Y.; H. Yoshimi; Y. Takagi; K. Kanno; S. Eguchi y F. Marumo. *Biomed. Res.*, 11:195, 1990.
- [270] Clozel M.; G.A. Gray; V. Breu; B.M. Löffler y R. Osterwalder. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 186:867, 1992.
- [271] Lynch C.J.; M.L. Steer; J.L. Smart y C. Deth. *Pharmacology*, 33:221, 1986.
- [272] Navran S.S.; S.E. Adair; S.K. Jemelka; C.L. Seidel y J.C. Allen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245:608, 1988.
- [273] Gupta S.; N.B. Ruderman; E.J. Cragoe Jr. y I. Sussman. *Am. J. Physiol.*, 261:II38, 1991.
- [274] Haddy F.J. y H.W. Overbeck. *Life Sci*, 19:935, 1976.
- [275] Mir M.A. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 23:1, 1988.
- [276] Morishita R.; J. Higaki y T. Ogihara. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 160:628, 1989.
- [277] Ilinson J.P.; G.P. Vinson; S. Kapas y R. Teja. *J. Endocrinology*, 128:275, 1991.
- [278] Mazzocchi G.; P. Rebuffat; V. Meneghelli; L. Malendowicz; A. Kasprzak y G.G. Nussdorfer. *Peptides*, 11:767, 1991.

- [279] Mazzocchi G.; L. Malendowicz y G.G. Nussdorfer. *Peptides*, 11:763, 1991.
- [280] Woodcock W.A.; P.J. Little y J.K. Tanner. *Biochem. J.*, 271:791, 1990.
- [281] Rosolowsky L.J. y W.B. Campbell. *Endocrinology*, 126:1860, 1990.
- [282] Simpson E.R. y M.R. Waterman. *libro*, 5:173, 1978.
- [283] Provencher P.H.; Y. Tremblay; S. Caron y A. Belanger. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 41:69, 1992.
- [284] Miller W.L.; M.M. Redfield y J.C. Burnett. *J. Clin. Invest.*, 83:317, 1989.
- [285] Lee T.S.; T. Chao; K.Q. Hu y G.L. King. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 162:381, 1989.
- [286] Cozza E.N.; S. Chiou y C.E. Gómez-Sánchez. *Am. J. Physiol.*, 262:R85, 1992.
- [287] Garay R.; C. Rosati; M. Braquet *et al.* *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13 (Suppl 5):S213, 1989.
- [288] Zeidel M.L.; H.R. Brady; B.C. Kone; S.R. Gullans y B.M. Brenner. *Am. J. Physiol.*, 257:C1101, 1989.
- [289] Sweadner K.J. *Biochim. et Biophys. Acta*, 988:185, 1989.
- [290] Krueger K.E. y V. Papadopoulos. *J. Biol. Chem.*, 265:15015, 1990.
- [291] Cozza E.N. y C.E. Gómez-Sánchez. *Am. J. Physiol.*,, (en prensa).
- [292] Hinson J.P.; G.P. Vinson; S. Kapas y R. Teja. *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.*, 40:381, 1991.
- [293] Simonson M.S. y J. Dunn. *Hypertension*, 15:I-5, 1990.
- [294] Iijima K.; L. Lin; A. Nasjletti y M.S. Goligorsky. *Am. J. Physiol.*, 260 (Cell Physiol. 29):C982, 1991.
- [295] Suzuki N.; H. Matsumoto C. Kitada; T. Masaki y M. Fujino. *J. Immunol. Methods*, 118:245, 1989.

- [296] McAllister R.G.; C.W. Van Way; K. Dayani; W.J. Anderson; E. Temple; A.M. Michelakis; W.S. Coppage y J.A. Oates. *Circ. Res.*, 28 (Suppl II):II-160, 1971.
- [297] Huttner I. y G. Gabbiani. *Hypertension*, page 473. Volume Vascular endothelium in hypertension, Mc Graw-Hill Co., New York, 1983.



Abreviaturas

ACTH	adrenocorticotrofina
ADP	adenosindifosfato
Ae	actividad específica
A I	angiotensina I
A II	angiotensina II
ALDO	aldosterona
AMG	aminoglutetimida
ANP	péptido natriurético atrial
ATP	adenosintrifosfato
B	corticosterona
18-OH-B	18-hidroxicorticosterona
BQ-123	nombre comercial de ciclo(D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp)
Ca⁺⁺-ATPasa	adenosintrifosfatasa dependiente de Ca ⁺⁺
cAMP	adenosinmonofosfato cíclico
CT	toxina de cólera
DAG	diacilglicerol
18-DAL	18-desoxialdosterona
diBu-cAMP	dibutiril-adenosinmonofosfato cíclico
DMSO	dimetilsulfóxido
DOC	11-deoxicorticosterona
18-OH-DOC	11-deoxi-18-hidroxi-corticosterona
EDCF	factor constrictor derivado del endotelio
EDTA	etilendiamintetracético (sal disódica)
EGF	factor de crecimiento epidermal
ET	endotelina
FK	forskolina
GDP	guanidindifosfato
GTP	guanidintrifosfato
H₇	1-(5-isoquinolinilsulfonil)2-metil piperazina
Hc	hematocrito
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
INT	violeta de p-nitrotetrazolio

IP₃	(1,4,5)-inositoltrifosfato
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MAG	monoacilglicerol
MIX	metilisobutilxantina
NAD	nicotinamin-adenin-difosfato
NADH	forma reducida del nicotinamin-adenin-difosfato
NADP	nicotinamin-adenin-trifosfato
NADPH	forma reducida del nicotinamin-adenin-trifosfato
Na⁺/K⁺-ATPasa	adenosintrifosfatasa dependiente de Na ⁺ y K ⁺
P₄	progesterona
P₅	pregnenolona
P-450_{SCC}	citocromo P-450 que escinde la cadena lateral del colesterol
P-450_{C21}	citocromo P-450 21-hidroxilasa
P-450_{11β}	citocromo P-450 (11β,18)-hidroxilasa/aldosintetasa
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PMA	1,3-miristato-13-acetato de forbol
POMC	proopiomelanocortina
RiA	radioinmunoensayo
S_{6b}	sarafotoxina 6b
SD	cepa Sprague Dawley
SDH	succínico-deshidrogenasa
SR/Jr.	cepa Dahl resistente a dieta con sal
SS/Jr.	cepa Dahl sensible a dieta con sal
St	staurosporina
TAG	triacilglicerol
TGFβ	factor de crecimiento transformante β
TLC	cromatografía en placa delgada
T_R	tiempo de retención
U.abs.	unidad de absorbancia
U.E.	unidad enzimática
VIC	péptido constrictor vasointestinal
VU	volumen urinario