Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Aspectos cinéticos metabólicos y estructurales en los últimos pasos de la biosíntesis de Aldosterona

Matkovic, Laura Beatriz

1999

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:
Matkovic, Laura Beatriz. (1999). Aspectos cinéticos metabólicos y estructurales en los últimos pasos de la biosíntesis de Aldosterona. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3118_Matkovic.pdf

Cita tipo Chicago:
Matkovic, Laura Beatriz. "Aspectos cinéticos metabólicos y estructurales en los últimos pasos de la biosíntesis de Aldosterona". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3118_Matkovic.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ASPECTOS CINÉTICOS, METABÓLICOS Y ESTRUCTURALES EN LOS ÚLTIMOS PASOS DE LA BIOSÍNTESIS DE ALDOSTERONA

Autor:

LAURA BEATRIZ MATKOVIC'

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO N. COZZA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

-1999-

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

KINETIC, METABOLIC AND STRUCTURAL ASPECTS OF THE LATE PATHWAY OF ALDOSTERONE BIOSYNTHESIS

Author:

LAURA BEATRIZ MATKOVIC'

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO N. COZZA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

-1999-

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo la elucidación de algunos aspectos (cinéticos, estructurales y metabólicos) relacionados con los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona (ALDO). La última etapa de la biosíntesis de ALDO involucra la oxidación mitocondrial de 11-desoxicorticosterona (DOC), a través de diferentes caminos siendo sus primeros metabolitos corticosterona (B) y 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona (18-OHDOC). Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas de la familia de los citocromos P-450. Una de estas enzimas es el citocromo CYP11B1 involucrado en la transformación de DOC a B y 18OHDOC. El otro citocromo involucrado, CYP11B2 es el responsable de la transformación de B a 18-hidroxicorticosterona (18-OHB) y a ALDO. Mediante los resultados obtenidos al trabajar con cortisol como sustrato alternativo en este camino metabólico se pudo clasificar a las enzimas presentes como sensibles a cortisol (SC) o insensible a cortisol (ISC), siendo esta clasificación compatible con la existencia de las dos enzimas clonadas CYP11B1 y CYP11B2. Cortisol inhibió competitivamente la transformación de B a ALDO y 18-OHDOC a ALDO. Por otro lado, se desarrollo un modelo matemático para el estudio de inhibidores suicidas. Se observó que 18-etinil-11-desoxicorticosterona (18-EtDOC) se comportaba como inhibidor suicida. Mediante la utilización del nuevo modelo propuesto se calcularon los diferentes valores de las constantes de inhibición para los diferentes pasos involucrados. Los valores obtenidos concuerdan nuevamente con la existencia de los dos citocromos CYP11B1 y CYP11B2.

Por otro lado se logró caracterizar un intermediario dimérico del camino de 18-OHB a ALDO, el cual resultó un buen sustrato para la biosintesis de aldosterona.

Mediante los estudios realizados y utilizando como base de estudio animales tratados con litio, se observó que la secreción de ALDO por la vizcacha (Lagostomus maximus maximus) es más sensible a estos tratamientos que esta secreción por la rata, especie usualmente utilizada en estos tipos de estudio. Se puede concluir que dado que el litio produce efectos colaterales en estos animales, se debería estudiar en humanos si estos efectos se repiten en los tratamientos crónicos con este ión.

Palabras claves: aldosterona, corticoidogénesis, corteza adrenal, citocromo P450, cortisol, 11β,18 hidroxilasa, inhibidores suicidas, litio.

Summary

This work aims at clarifying certain kinetic, structural and metabolic aspects of the last steps of the biosynthesis of aldosterone (ALDO). These steps comprise the mitochondrial oxidation of 11-deoxycorticosterone (DOC) through different pathways, their first metabolites being corticosterone (B) and 18 hydroxy 11-deoxycorticosterone (18OHDOC). All these reactions are catalyzed by enzymes of the cytochrome P450 family. One of these enzymes is cytochrome CYP11B1 involved in the transformation of DOC to B and 18OHDOC, the other one being CYP111B2, catalyzing the transformation of B to 18-hydroxycorticosterone (18OHB) and ALDO. In view of the results obtained with cortisol as an alternative substrate, enzymes could be classified into those sensitive to cortisol (SC) or unsensitive to cortisol (USC), this categorization being compatible with the occurrence of two cloned enzymes CYP11B1 and CYP11B2. Cortisol inhibited competitively the transformation of B to ALDO and 18OHDOC to ALDO. We also developed a mathematical model for the study of suicide-inhibitors. Employing this new model, values were calculated for the inhibtion constants of the different steps involved. The obtained values again agree with those of the two cloned cytochromes CYP11B1 and CYP11B2.

We also characterized a dimeric intermediate between 18OHB and ALDO, which showed to be a good substrate for aldosterone biosynthesis.

In these studies and others with animals treated with lithium, we found that ALDO secretion by the "vizcacha" (Lagostomus maximus maximus) is more sensitive to these treatments than this secretion by the rat, the latter being the species usually employed in these studies. Since lithium produces collateral effects in these specimens, clinical investigations should be carried out on the effects of chronic treatments with lithium in human.

Keywords: aldosterone, corticoidogenesis, adrenal cortex, cytochrome P450, cortisol, 11β,18 hydroxylase, suicide inhibitors, lithium.

A Pablo, Alejo, Goran, y Nadia

Agradecimentos

Al Dr. Eduardo N. Cozza como director, por haberme brindado los medios y los consejos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos P. Lantos por haberme permitido la posibilidad de trabajar bajo su dirección.

A la Dra. Alcira Aragonés por haberme enseñado a trabajar durante mis primeros pasos en investigación.

Al Dr. Celso Gomez Sanchez por facilitarme los anticuerpos antialdosterona y anticorticosterona.

Al Marion Merrell Dow Research Institute ya que por su intermedio se hizo posible el trabajo con el inhibidor suicida.

Al Dr. J.A. Guzmán por facilitarnos nuevos materiales de estudio, como ser un nuevo modelo animal (Lagostomus maximus maximus).

A la Dra. Alicia Seldes y al Sr. G. Arabehety (y por su intermediario al Lanais) por la realización de los espectros de masa FAB.

A la Dra. Rosa Lederkremer y a sus colaboradores (Laura, Rosalía, Carola y Carlos), por facilitarme el uso del contador de centelleo.

Al Dr. Marcel Harnik por facilitar los esteroides necesarios para la realización de estos estudios.

A Damián Romero, por ser mi mejor compañero del laboratorio 1.300.001.

A la Dra. Adalí Pecci quien compartió mis primeros pasos en este laboratorio

A Carolina Reinsenman con quien compartí parte de mi trabajo con cortisol.

A Guillermo Vicent y Mario Galigniana por los gratos momentos compartidos.

A la Dra. Cristina Damasco y a Pilar Igarreta.

A la Sra. Maria Elisa Otero y a Rubén Di Paola por su apoyo técnico en los diversos experimentos llevados a cabo a lo largo de toda esta tesis.

A la Sra. Norma Nazar y a Felisa por mantener la limpieza del laboratorio.

A Adriana Cochón (y a sus compañeros de laboratorio) por su afecto.

A todos los integrantes del Departamento de Química Biológica por todos estos años compartidos.

Al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales, por haberme brindado el espacio y el apoyo económico para llevar a cabo mi trabajo.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Fundación Antorchas, a la Universidad de Buenos Aires por el imprescindible sustento económico.
A mi familia.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN **2**

1.1 La glándula adrenal. Aspectos históricos 2

1.2 La corteza adrenal 5

1.2.1 Aspectos anatómicos *5*

1.2.2 Aspectos histológicos *5*

1.3 Generalidades de las reacciones de biosíntesis de esteroides adrenales 11

1.4 Química de los esteroides 18-hidroxilados 14

1.5 Citocromos P450 16

1.5.1 En General *16*

1.5.2 En particular *21*

1.6 Los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona 26

1.7 Aislamiento de los citocromos P450 mitocondriales 31

1.8 Síntesis de aldosterona en otras especies 40

1.9 Aldosteronismo 41

1.9.1 Aldosteronismo primario *41*

1.9.2 Aldosteronismo suprimible por glucocorticoides *43*

1.9.3 Análisis de laboratorio *46*

1.10 Producciones de aldosterona y cortisol: recombinación genética y mutaciones 47

1.10.1 Deficiencia de 11β-hidroxilasa *50*

1.10.2 Deficiencia de aldosterona sintetasa *51*

1.11 Inhibidores suicidas 53

1.12 Planteo del trabajo 54

CAPÍTULO 2

DISEÑO EXPERIMENTAL.....45

2.1 ESTRATEGIAS Y CONSIDERACIONES EN EL TRABAJO CON CITOCROMOS P-450 45

2.2 PREPARACIÓN DE LA FUENTE ENZIMÁTICA. METODOLOGÍA STANDARD DE TRABAJO. 46

2.3 SOLUBILIZACIÓN DE LOS PRECURSORES DE ALDOSTERONA.....48

2.4 TRATAMIENTO DE LOS INCUBADOS.....48

2.5 DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES POR HPLC.....49

2.6 CUANTIFICACIÓN DE ESTEROIDES POR HPLC.....51

2.6.1 De esteroides no radioactivos *51*

2.6.2 De esteroides radioactivos. *52*

2.7 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ESTEROIDES RADIOINERTES POR RIA.....54

2.8 DETERMINACIÓN DE ALDOSTERONA. 55

2.9 DETERMINACIÓN DE CORTICOSTERONA 55

2.10 CÁLCULO DE LA MASA DEL ESTEROIDE EN ESTUDIO. 55

2.11 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DEL ANTICUERPO.....56

2.12 CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO.....57

2.13 ELECCIÓN DEL BUFFER APROPIADO 58

2.14 TIEMPO DE INCUBACIÓN.....59

2.15 REQUERIMIENTOS DE IONES Ca^{++} Y/O Mg^{++}.....59

2.16 REEMPLAZO DEL IÓN Ca^{++} POR OTROS IONES. 62

2.17 ¿CUÁL ES LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CALCIO? 63

2.18 ¿CUÁL ES LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MAGNESIO ?.....66

2.19 MÉTODOS SEPARATIVOS: SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS 68

2.19.1 Cromatografía en papel.....*68*

2.19.2 Cromatografía en capa delgada.....*69*

2.19.3 Cromatografía en HPLC.....*70*

CAPÍTULO 3

INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE LA ALDOSTERONA POR EL CORTISOL EN LA MITOCONDRIA DE ADRENAL DE RATA. 74

3.1 ENZIMAS SENSIBLES A CORTISOL Y NO SENSIBLES A CORTISOL. INTRODUCCIÓN 74

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS 75

3.2.1 Preparación e incubación de las mitocondrias 75

3.2.2 Separación y cuantificación 76

3.2.3 Misceláneas 78

3.3 RESULTADOS 78

3.3.1 Cuantificación de radiometabolitos 78

3.4 CAPACIDAD BIOSINTÉTICA PARA ALDOSTERONA 79

3.5 EFECTO DE CORTISOL 80

3.6 UNIÓN DEL CORTISOL Y SU METABOLISMO 81

3.7 TRANSFORMACIÓN DE 11,18-EPOXICORTICOSTERONA EN ALDOSTERONA 85

3.8 DISCUSIÓN 85

CAPÍTULO 4

UN MODELO SIMPLE PARA LA INTERPRETACIÓN CINÉTICA DE INHIBIDORES SUICIDAS 91

4.1 INTRODUCCIÓN 91

4.2 ENFOQUE EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO 93

4.3 MODELO MATEMÁTICO 93

4.4 MEDICIÓN DE *(EI)* 96

4.5 MATERIALES Y MÉTODOS 100

4.6 PREPARACIÓN E INCUBACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS 100

4.7 DETERMINACIÓN DE LOS ESTEROIDES 101

4.8 MISCELÁNEAS 103

4.9 RESULTADOS 103

4.10 DISCUSIÓN 112

CAPÍTULO 5

TRANSFORMACIÓN NO ENZIMÁTICA DE 18-HIDROXICORTICOSTERONA EN OTROS DERIVADOS LIPOFÍLICOS SEGUIDOS POR ESPECTROSCOPÍA DE MASA, FAST ATOM BOMBARDMENT..... 115

5.1 CARACTERIZACIÓN DE UN DÍMERO DE 18-HIDROXICORTICOSTERONA..... 115

5.2 REACTIVOS..... 121

5.3 REACCIONES..... 121

5.4 ESPECTROSCOPÍA DE MASA..... 122

5.5 SELECCIÓN DE LA MATRIZ MÁS FAVORABLE..... 122

5.6 ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS POR FAB..... 126

5.7 ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS POR CROMATOGRAFÍA EN PAPEL. USO DE HCL COMO MEDIO DE REACCIÓN..... 131

5.8 ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS POR CROMATOGRAFÍA EN HPLC..... 134

5.9 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS..... 137

5.10 DÍMERO DE 18-OHB COMO SUSTRATO EN EL CAMINO DE BIOSÍNTESIS DE ALDOSTERONA..... 138

5.10.1 Incubaciones..... 138

5.10.2 Resultados..... 138

5.10.3 Conclusiones..... 140

CAPÍTULO 6

EFECTOS DEL LITIO SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS DE ADRENAL DE RATA Y VIZCACHA. 141

6.1 INTRODUCCIÓN 141

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS 142

6.2.1 Animales tratados 142

6.2.2 Materiales 142

6.2.3 Extracción de los esteroides de plasma 143

6.2.4 Radioinmunoensayos 143

6.2.5 Incubaciones 144

6.3 RESULTADOS 144

6.3.6 Niveles de esteroides en suero 144

6.3.7 Actividad enzimática. 145

6.4 DISCUSIÓN 147

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES *149*

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA *152*

CAPÍTULO 1

Lista de Figuras

Figura 1.1: *Representación esquemática de la corteza adrenal.* 5

Figura 1.2: *Núcleo de los corticoides adrenales, pregnanoesteroides* 6

Figura 1.3: *Estructuras químicas de algunos esteroides adrenales.* 7

Figura 1.4: *Distribución zonal de la síntesis de esteroides en la glándula adrenal* 9

Figura 1.5: *Esquema de la cadena hidroxilante del citocromo P450* 11

Figura 1.6: *Esquema general para las reacciones de hidroxilación irreversible (A) y deshidrogenación reversible (B).* 12

Figura 1.7: *Secuencia principal para la formación de aldosterone a partir de colesterol.* 17

Figura 1.8: *Síntesis de glucocorticoides y estrógenos en la glándula adrenal* 19

Figura 1.9: *Pasos alternativos para la producción de aldosterona a partir de 11-desoxicorticosterona* 22

Figura 1.10: *Mecanismo propuesto para la biosíntesis de aldosterona* 23

Figura 1.11: *Síntesis de 18-DAL a partir de 18-OHB.* 24

Figura 1.12: *Tres hipótesis diferentes acerca de la enzima involucrada en el camino biosintético desde 11-desoxicorticosterona (DOC) hasta aldosterona (ALDO)* 28

Figura 1.13: *Conversión de corticosterona en aldosterona y de cortisol en 18-oxocortisol.* 35

Lista de Tablas

Tabla 1.1: *Cambios necesarios requeridos para la conversión de colesterol en corticosteroides, andrógenos y estrógenos* 20

Tabla 1.2: *Alteraciones enzimáticas en la biosíntesis de aldosterona* 39

CAPÍTULO 2

Lista de Figuras

Figura 2.1: *Cromatograma obtenido al correr diferentes esteroides en HPLC* ____ *51*

Figura 2.2: *Curva de calibración para corticosterona* ____ *53*

Figura 2.3: *Esquema de recolección del esteroide purificado por HPLC* ____ *54*

Figura 2.4: *Curva para el cálculo del título de anticuerpo antialdosterona.* ____ *58*

Figura 2.5: *conversión DOC a ALDO* ____ *60*

Figura 2.6: *Conversión de: Panel A) DOC a ALDO, Panel B) B a ALDO en presencia o ausencia de los iones divalentes* Ca^{++} *y* Mg^{++} ____ *62*

Figura 2.7: *Incidencia del ión divalente agregado al buffer de incubación, concentración de los iones divalentes 2.8 μM* ____ *64*

Figura 2.8: *Conversión de DOC a ALDO a concentraciones de* Ca^{++} *variables, desde 0 a 3.7μM.* ____ *65*

Figura 2.9: *Conversión de DOC a B a diferentes concentraciones de* Ca^{++}*, desde 0 a 3.7μM* ____ *67*

Figura 2.10: *Conversión de DOC a ALDO a diferentes concentraciones de* Mg^{++}*, desde 0 a 2.1μM* ____ *68*

Lista de Tablas

Tabla 2.1: *Composición del buffer Krebs Ringer Bicarbonato Glucosa.* ____ *48*

Tabla 2.2: *Cantidad de aldosterona obtenida a partir de 11-desoxicorticosterona y a partir de corticosterona* ____ *59*

Tabla 2.3: *Protocolo seguido para investigar la influencia de los iones calcio (2.8μM) y magnesio (1,2μM) en solución* ____ *61*

Tabla 2.4: *protocolo para el estudio del cambio de iones* Ca^{++} *por otros de diferente radio iónico e igual carga* ____ *63*

CAPÍTULO 3

Lista de Figuras

Figura 3.1: Gráficos de Lineaweaver-Burk para la formación de aldosterona a partir de corticosterona (B), en el panel superior y 11,18-epoxycorticosterona (18-DAL) ____ *87*

Lista de Tablas

Tabla 3.1: *Actividad específica (AE) de la fracción que se comporta como si fuera aldosterona* ____ *79*

Tabla 3.2 *K_M y V_{MAX} aparentes* ____ *80*

Tabla 3.3: *Proporción de la transformación de sustrato en el producto indicado en presencia (+) o ausencia (-) de cortisol sobre la proporción de la transformación en ausencia de cortisol (-)* *82*

Tabla 3.4: *Unión específica de cortisol a la adrenal de rata* ____ *83*

Tabla 3.5: *Estudio del efecto de 11,18-epoxicorticosterona (18DAL)* ____ *84*

CAPÍTULO 4

Lista de Figuras

Figura 4.1: *Esquema de las especies reactivas formadas a partir de la oxidación de un grupo acetileno* ____ *92*

Figura 4.2: *Extracciones de DOC y B con mezcla de hexano y cantidades variables de cloruro de metileno* ____ *102*

Figura 4.3: *: Se muestra la constancia en los niveles de corticosterona durante la inhibición por 18- EtDOC a diferentes dosis de inhibidor suicida* ____ *106*

Figura 4.4: *Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión DOC a ALDO y DOC a B* ____ *109*

Figura 4.5: *Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión corticosterona → aldosterona* ____ *110*

Figura 4.6: *Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona → aldosterona* ____ *111*

Lista de Tablas

Tabla 4.1: *Efecto de la inhibición por 18-EtDOC y de cortisol sobre la producción de aldosterona, en la conversión DOC → ALDO* ____ *104*

Tabla 4.2: *Se muestra la dosis dependencia de la inhibición por 18-EtDOC en la producción de aldosterona a diferentes dosis de inhibidor suicida* ____ *105*

Tabla 4.3: *Estudio de la influencia del lavado posterior al tratamiento con el inhibidor, ya sea 18-EtDOC o cortisol* ____ *107*

Tabla 4.4: *Estudio de la influencia de NADPH durante el tratamiento con el inhibidor 18-EtDOC* ____ *107*

Tabla 4.5: *Estudio de la influencia del inhibidor 18-EtDOC en la conversión colesterol → pregnenolona* ____ *108*

Tabla 4.6: *Cálculo de las constantes de inhibición para las diferentes transformaciones. 113*

CAPÍTULO 5

Lista de Figuras

Figura 5.1: *Formas tautoméricas de aldosterona* ____ *116*

Figura 5.2: *18-hidroxicorticosterona en medio ácido* ____ *117*

Figura 5.3: *Formas de 18-OHDOC* ____ *118*

Figura 5.4: *Dímero de aldosterona* ____ *119*

Figura 5.5: *Espectro de 18-OHB, matriz glicerol.* ____ *122*

Figura 5.6: *Espectro de 18-OHB, matriz NOBA.* ____ *123*

Figura 5.7: *Espectro de 18-OHB, matriz glicerol + amoníaco.* ____ *124*

Figura 5.8: *Secuencia de reacciones esperables durante el tratamiento con ácido p-toluensulfónico.* ____ *127*

Figura 5.9: *Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por espectroscopia de FAB, y graficada en función de la abundancia respecto del pico masa* ($M+H^+$). ____ *128*

Figura 5.10: *Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por espectroscopia de FAB, y graficada tomando como 100% de conversión a la suma del % de 18-OHB, 18-DAL y DIMERO.* ____ *129*

Figura 5.11: *Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por HPLC* ____ *134*

Figura 5.12: *: Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por HPLC, solvente levemente ácido* ____ *135*

Figura 5.13: *Espectro de MS-FAB del compuesto que corre con un Rm 4.33* ____ *136*

Figura 5.14: *Incubación de diferentes precursores de aldosterona* ____ *138*

Lista de Tablas

Tabla 5.1: *valores de* ($M+H^+$) *para diferentes esteroides* ____ *125*

Tabla 5.2: *Picos* $M+H^+$ *en la conversión de 18-OHB en medio ácido.* ____ *126*

Tabla 5.3: *Rf obtenidos por cromatografía en papel, sistema Bush B5* ____ *130*

Tabla 5.4: *Reacción de 18-OHB en medio ácido de p-toluensulfónico* ____ *132*

Tabla 5.5: *Tratamiento de 18-OHB en medio ácido diluido al medio* ____ *132*

Tabla 5.6: *Tr de los diferentes compuestos cromatografiados por HPLC* ____ *133*

CAPÍTULO 6

Lista de Tablas

Tabla 6.1: *Concentraciones plasmáticas de corticosterona* ____ *145*

Tabla 6.2: *Concentraciones plasmáticas de aldosterona.* ____ *145*

Tabla 6.3: *conversión de 11-desoxicorticosterona a corticosterona (DOC → B).* ____ *146*

Tabla 6.4: *conversión de 11-desoxicorticosterona a aldosterona (DOC → ALDO).* ____ *146*

ABREVIATURAS

11-βHSD	11β hidroxiesteroide deshidrogenasa
18-DAL	11-desoxialdosterona, 11,18-epoxi-corticosterona
18-EtDOC	18-etinil-11-desoxicorticosterona
18-OHB	18-hidroxicorticosterona
18-OHDOC	18-hidroxi-11-desoxicorticosterona
18-OHF	18-hidroxicortisol
ACTH	adenocorticotrofina
AE	actividad específica
ALDO	aldosterona
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
B	corticosterona
CMO I	carboximetiloxidasa I
CMO II	carboximetiloxidasa II
CYP11B1	11β hidroxilasa cataliza DOC →B y DOC → 18OHDOC
CYP11B2	11β hidroxilasa/aldosintetasa cataliza B → 18-OHB y B → ALDO
DOC	11-desoxicorticosterona
F	cortisol
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ip	vía de inoculación intraperitoneal
ISC	enzimas insensibles a cortisol
m/e	relación carga masa
M^+	ión molecular
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
$P450_{scc}$	Citocromo P450 que escinde la cadena lateral del colesterol
$P450_{11\beta}$	citocromo P450 (11β,18)hidroxilasa/aldosintetasa
RIA	radioinmunoensayo
SC	enzimas sensibles a cortisol
TLC	Cromatografía en capa delgada

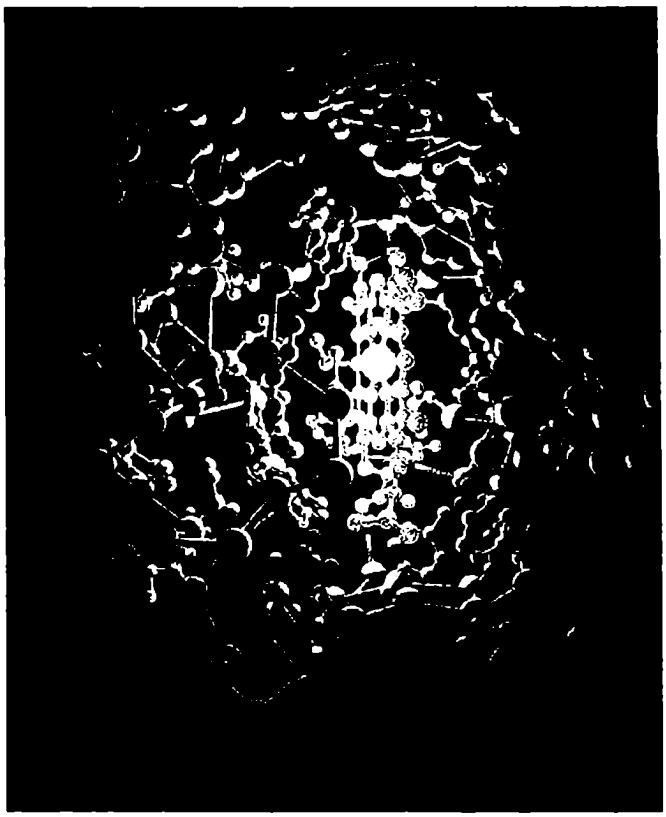
Los experimentos y resultados de esta Tesis Doctoral fueron publicados parcialmente y forman parte de los siguientes trabajos.

Alteraciones en la enzimología de la producción de aldosterona. L.B.Matkovic', C.Gomez-Sanchez, C.P.Lantos y E.N.Cozza. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol. XXXII, N°1, 3-12, 1998.

Inhibition of aldosterone formation by cortisol in rat adrenal mitochondria. L.B. Matkovic', C.E. Gomez-Sanchez, C.P. Lantos and E.N. Cozza. Steroids 60: 447-452 (1995).

Cortisol: a tool to study aldosterone biosynthesis in rats. L.B. Matkovic', C.E. Gomez-Sanchez, C.P. Lantos and E.N. Cozza. Endocrine Research 21(1-2): 471-474 (1995).

Enzimología de la biosíntesis de aldosterona. Una revisión. L.B. Matkovic' y E.N. Cozza. Acta Bioquímica Latinoamericana, Vol. XXIX, No.2, 159-165, 1995.



INTRODUCCION

Capítulo 1 Introducción

1.1 La glándula adrenal. Aspectos históricos

Las glándulas adrenales son órganos complejos y multifuncionales que forman parte del sistema endócrino, o sea que están relacionados con la secreción interna de hormonas. Las mismas son liberadas al medio por células específicas, y son llevadas por el torrente sanguíneo para actuar sobre una célula blanco alejada. La naturaleza esencial de estas glándulas es conocida desde la segunda mitad del siglo XIX. Se sabía desde entonces que la atrofia de las mismas producía una enfermedad severa y que la muerte ocurría si se las extirpaba completamente. La separación de zonas en corteza y médula era conocida desde 1805 (1) y descripta por Huschke, E. en 1845 quien fue el primero en utilizar estos términos para la glándula adrenal (2). Recién en 1846 Ecker, A. (3) dio una descripción histológica más detallada de la glándula adrenal. No deberíamos olvidar que en 1831 Arnold, F. (4) fue el primero que estudió la embriología de la glándula pero creyó, erróneamente, que las mismas derivaban de los cuerpos wolfianos.

En 1855 Thomas Addison (5) notó las primeras evidencias concretas de la naturaleza vital de las glándulas adrenales describiendo con precisión los síntomas de la insuficiencia adrenal y su asociación con la destrucción de las mismas por diversas enfermedades infecciosas y con lesiones neoplásicas.

En 1856 Brown-Séquard, E. (6) demostró mediante la extirpación de dichas glándulas que su presencia y funcionamiento eran vitales. Esto fue rápidamente puesto en duda por Addison que alegaba que los experimentos llevados a cabo por Brown-Séquard no estuvieron bien controlados y como consecuencia de esto la muerte de los animales podría deberse tanto al shock y la sepsia, como a la verdadera insuficiencia de las glándulas adrenales.

Durante la segunda mitad del siglo XIX se observaron pocos adelantos acerca de la fisiología adrenal, no siendo así los avances respecto de las relaciones estructurales de los distintos tejidos de la glándula y su desarrollo. La zonación de la corteza adrenal fue reconocida por Harley, G. en 1858 (7) y fue Arnold, J. en 1866 (8) quien introdujo los términos glomerulosa, fasciculata y reticularis. El origen independiente de la médula y su homología con elementos ganglionicos fue descripto por Balfour, F.M. en 1878 (9) conjuntamente con Mitsukuri, K. en 1882

(10).

La glándula adrenal es una combinación de dos entidades funcionales diferentes. La zona externa o corteza, que comprende entre el 80 y el 90% de la glándula, deriva del tejido mesodérmico y es la responsable de la síntesis de las hormonas esteroideas. La zona interna o médula, que comprende entre el 10 y el 20% restante, deriva de células neuroectodérmicas de los gánglios simpáticos y es la fuente de las hormonas catecolamínicas. La catecolamina –adrenalina- fue aislada y caracterizada recién en 1901.

Los esteroides 11-dehidrocorticosterona (compuesto A) y la cortisona (compuesto E) fueron caracterizadas en 1936; corticosterona (compuesto B) y cortisol (compuesto F) en 1937 y 11-desoxicortisol (sustancia S) y 11-desoxicorticosterona (sustancia Q) en 1938. Por estudios químicos resultaron que todos estos esteroides poseían 21 átomos de carbono y se los conoce como Compuestos C-21. Se supuso entonces que por su estructura todos deberían ser sintetizados a partir del colesterol aunque la prueba directa no apareció hasta 1951 con el trabajo de Hechter, O. (11).

Para fines de la década del '40 muchos grupos comenzaron a reinvestigar la fracción amorfa de los extractos corticales con la esperanza de encontrar un nuevo corticoide. El premio se lo llevaron Simpson, E.R. y Tait, J.F. (12) quienes trabajando en el Hospital de Middlesex, observaron que un nuevo componente no identificado hasta el momento aparecía en el extracto adrenal comercial y que tenía un marcado efecto sobre el balance electrolítico urinario en ratas adrenalectomizadas (Tait, J.F. y Tait, S.A.S. 1978 (13)). El éxito llegó junto con el auge de dos nuevos métodos de laboratorio, la cromatografía en papel con sistemas tipo Bush (14) y un bioensayo para mineralocorticoides. La "electrocortina" fue aislada en 1952 y denominada años más tarde como aldosterona luego de que su estructura fuera determinada en un trabajo de equipo entre el grupo de Middlesex y Reichstein, vonEuw, J., Schindler, O., Wettstein, A. y Neher, R. en Basel en 1954 (15). La primera vez que se pudo aislar aldosterona del hombre fue en 1954 y fue realizado por Luetscher, J.A. y Johnson, B.B. (16). En 1955 Conn, J.W. (17) determinó los síntomas de su exceso patológico en asociación con ciertos tumores adrenocorticales. Cabe destacar que la firme asociación entre síndromes clínicos específicos que resultan de excesos o deficiencias de cada tipo de hormona suprarrenal fue lo que condujo a los científicos al estudio y aislamiento de esas hormonas, como así también al conocimiento de sus vías biosintéticas.

1.2 La corteza adrenal

Aspectos anatómicos

Ambas glándulas adrenales están ubicadas en el retroperitoneo, justo por encima de cada riñón y están rodeadas por una cápsula de tejido conectivo, y embebidas en tejido adiposo. La cápsula de tejido conectivo penetra hasta las zonas más profundas de la glándula.

Como se ha expuesto anteriormente la glándula adrenal es una combinación de dos entidades funcionales separadas, la zona externa o corteza que abarca cerca de un 80% de la glándula, proviene del tejido mesodérmico y es la fuente de hormonas esteroideas y, la zona interna o médula que comprende entre el 10 y 20% restante, deriva de células neuroectodérmicas de los ganglios simpáticos y es la fuente de hormonas catecolamínicas.

Tanto la corteza como la médula están altamente irrigadas; la sangre arterial proviene de ramas de la aorta, arterias renales y arterias frénicas y posee uno de los flujos sanguíneos más altos del cuerpo, por gramo de tejido. La vena suprarrenal derecha drena en la vena cava inferior, mientras que la izquierda drena directamente en la vena renal de ese mismo lado.

Aspectos histológicos

El aspecto histológico de la zona cortical de la glándula puede dividirse en tres zonas (Figura 1.1) (18).

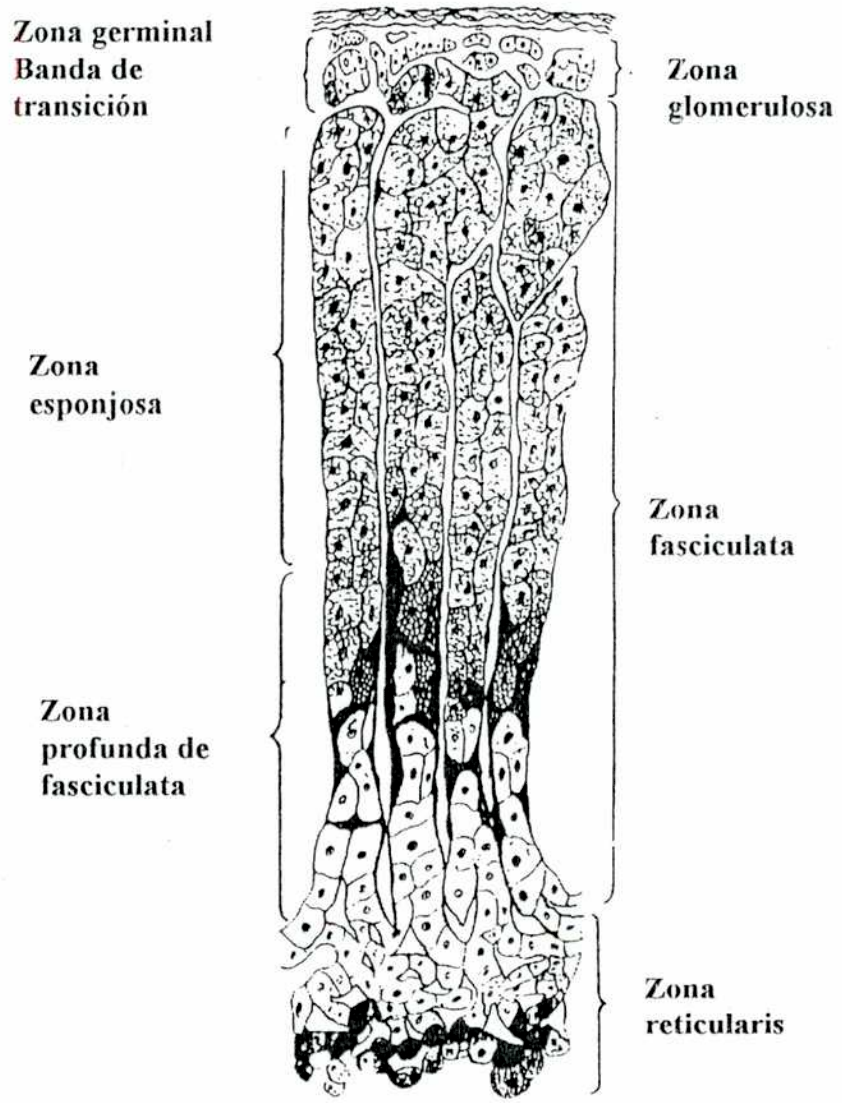


Figura 1.1: Representación esquemática de la corteza adrenal.

numerosas mitocondrias elongadas con crestas lamelares. La zona fasciculata media es la más ancha y está formada por células columnares que forman largos cordones. Su citoplasma está altamente vacuolado y contiene gotitas de grasa; las mitocondrias son de gran tamaño y poseen numerosas crestas vesiculares dentro de sus membranas. La tercer zona, la reticularis, la más interna de las tres, consta de redes de células interconectadas con menos gotas lipídicas y con mitocondrias similares a las de las células de la zona fasciculata.

Bajo ciertas condiciones fisiopatológicas los tamaños de las zonas glomerulosa y fasciculata varían. Por ejemplo, bajo el estímulo de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (19) el tamaño y el número de las células en la zona fasciculata y en la reticular aumentan y en glomerulosa bajan. Las mitocondrias en estas células son más numerosas y grandes y aparecen ribosomas centrales, crestas vesiculares y membranas polilamelares las cuales se extienden hasta unas vacuolas que contienen colesterol. Además se observa aumento del retículo endoplasmático. Si se realiza un estudio con dieta baja en sodio los resultados son inversos, o sea las células de la zona glomerulosa aumentan en número mientras que bajan las de la zona fasciculata. La marcación de las zonas se realiza mediante la utilización de anticuerpos específicos anticitocromos P450 (CYP11B1 y CYP11B2) (trabajos de Yanagibashi, K. et al. (1986) (20) y Ogishima, T. et al. (1992)(21)).

Las hormonas sintetizadas en la corteza suprarrenal derivan de un mismo núcleo esteroideo (Figura 1.2).

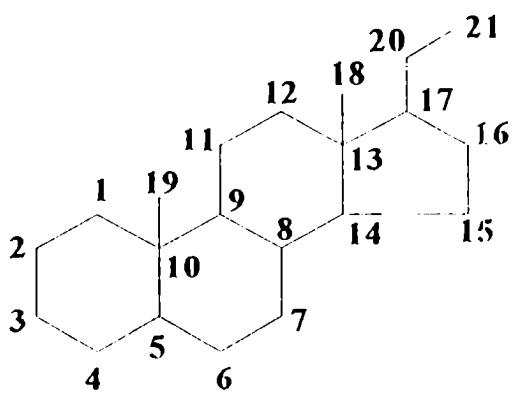


Figura 1.2: Núcleo de los corticoides adrenales, pregnanoesteroides. Numeración de sus carbonos

Algunas de las enzimas presentes en la corteza adrenal son capaces de hidroxilar las posiciones 21, 11 y 18 de los pregnanoesteroides. La zona glomerulosa produce corticosterona, 18-hidroxicorticosterona y aldosterona. La zona fasciculata reticular en cambio, no produce aldosterona, pero sí produce corticosterona y 18-hidroxicorticosterona y, en las especies que corresponde (humano, bovino, porcino), produce cortisol. Este último esteroide se diferencia de corticosterona en la aparición de un hidroxilo en la posición 17α (enzima 17α -hidroxilasa, CYT $P450_{17\alpha}$). La adrenal de rata no posee la enzima encargada de hidroxilar esta posición (Figura 1.3).

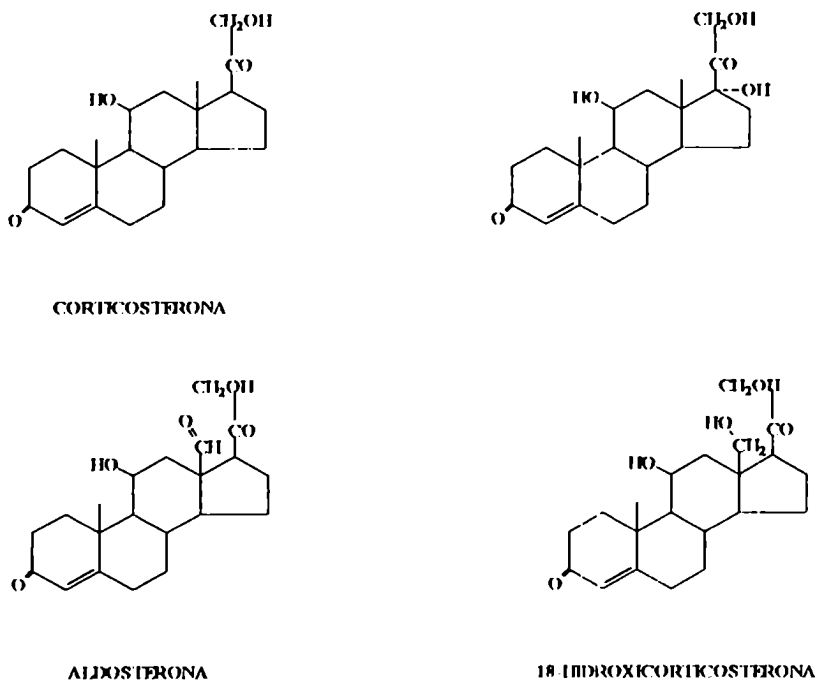


Figura 1.3: Estructuras químicas de algunos esteroides adrenales.

Es así como surge la evidencia de que algún esteroide puede ser formado en todas las zonas pero sólo actúa como precursor en una de ellas y como hormona en otra. Es decir, puede decirse que la razón de ser de la zona glomerulosa sería la de suministrar el mineralocorticoide más potente (aldosterona) mientras que la formación en ella de progesterona y corticosterona cumpliría un rol precursor. El rol de las zonas fasciculata y reticular, en cambio, es producir grandes cantidades de corticosterona utilizada por el organismo como hormona.

El colesterol es el precursor para todas las hormonas esteroides adrenocorticales. Este esteroide circula en sangre unido a lipoproteínas que se denominan por su densidad; i.e. LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Las células de la corteza adrenal expresan receptores a una lipoproteína, dependiendo de la especie será la lipoproteína que se una. Así por ejemplo, en rata los receptores son específicos para LDL mientras que en humanos, los receptores unen HDL. Al fijarse las lipoproteínas a sus receptores específicos son luego transferidas dentro de la célula por un mecanismo de endocitosis y el colesterol es principalmente esterificado y almacenado en vacuolas citoplasmáticas. Otra fuente de colesterol es la síntesis en las células adrenales a partir de acetil CoA. Sin embargo la fuente de colesterol principal es la obtenida a partir del colesterol libre presente en el plasma sanguíneo, el cual proviene de la dieta. El obtenido por síntesis "de novo" es el componente minoritario en el "pool" a utilizar para la síntesis de esteroides.

La síntesis de glucocorticoides -cortisol y corticosterona- tiene lugar principalmente en la zona fasciculata y en menor medida en la zona reticular. Estas hormonas son indispensables para la vida en virtud de sus efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y de las proteínas.

Además, en la glándula adrenal, se sintetizan también hormonas esteroideas sexuales. Los andrógenos y estrógenos son sintetizados principalmente en la zona reticular como así también en la zona fasciculata; su importancia se debe a que son las hormonas encargadas de establecer y mantener los caracteres sexuales secundarios.

Por último la síntesis y secreción de aldosterona, principal mineralocorticoide en todos los mamíferos estudiados, son llevadas a cabo exclusivamente por la zona glomerulosa, y es de importancia vital ya que es la encargada de mantener el balance de sodio y potasio y así su ausencia produce la muerte (Figura 1.4) (22).

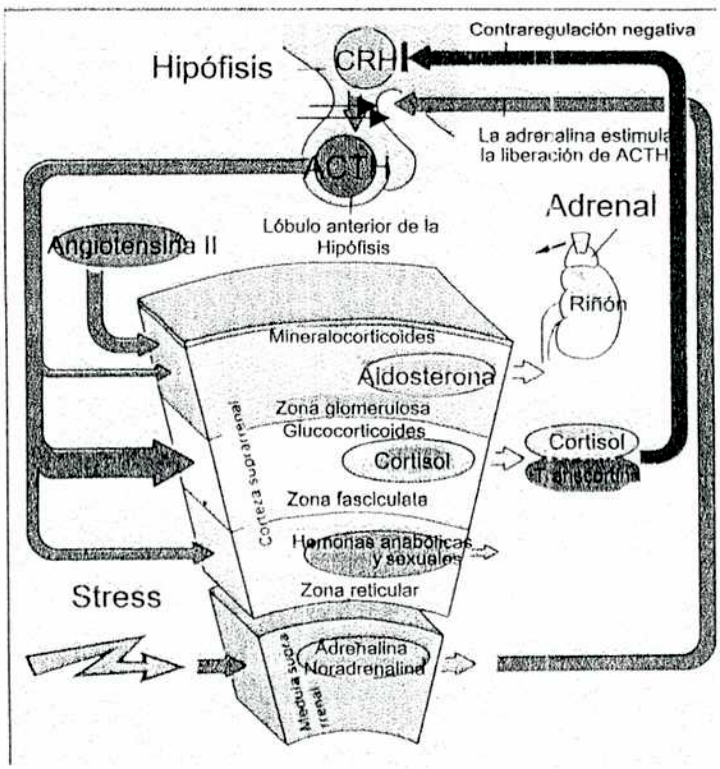


Figura 1.4: Distribución zonal de la síntesis de esteroides en la glándula adrenal

Por estudios sobre la relación entre estructura y función pudieron establecerse las necesidades estructurales de los esteroides para cumplir las funciones glucocorticoidea y mineralocorticoidea. Los glucocorticoides potentes requieren una cetona en la posición C-3 y de grupos oxhidrilos en posiciones C-11 y C-21 lo que resulta en la no-coplanaridad de los carbonos de los anillos B, C y D. Los mineralocorticoides potentes necesitan un carbono oxigenado en la posición C-18 y una tendencia a la coplanaridad de los carbonos de los anillos C y D. Los andrógenos potentes carecen de cadena lateral C20-21 y poseen un carbono oxigenado en posición

C-17. Los estrógenos se caracterizan por la aromatización del anillo A. Un resumen de los trabajos preliminares llevados a cabo sobre los grupos sustituyentes fue realizado por Hayano, M. et al. en 1956 (23).

1.3 Generalidades de las reacciones de biosíntesis de esteroides adrenales.

Aldosterona es el mineralocorticoide primario en todos los mamíferos estudiados. Tal uniformidad no ocurre con los glucocorticoides. En efecto, mientras el cortisol es el glucocorticoide primario en la vaca, el cerdo y el ser humano; la rata y el ratón tienen para la misma función, a la corticosterona, ya que no pueden sintetizar cortisol (ver más adelante).

La función principal de la aldosterona es mantener el volumen del líquido extracelular mediante la conservación del sodio corporal. Por lo tanto, la aldosterona es secretada principalmente como respuesta a señales originadas en el riñón cuando existe una reducción en el volumen de líquido circulante. Si en la dieta existe una disminución de sodio, por ejemplo, la caída consecuente en el líquido extracelular y en el volumen del plasma ocasiona una disminución del flujo sanguíneo arterial renal y en la presión arterial (24).

Los conocimientos acumulados por las investigaciones llevadas a cabo sobre el tema permiten hoy establecer que la enzimología de la biosíntesis de aldosterona en la glándula adrenal humana se parece mucho más a la de la rata y el ratón que a la de la vaca y el cerdo.

Hay tres tipos de reacciones enzimáticas que median las transformaciones entre colesterol y aldosterona, dos de naturaleza oxidativa (hidroxilaciones y deshidrogenaciones) y una de naturaleza reductiva.

Los avances a través del camino metabólico en general se consiguen por hidroxilaciones (25). Estas oxidaciones se caracterizan por ser irreversibles, por dar lugar a esteroides con capacidad hormonal y precursora (corticosterona, progesterona) así como hormonal pura (aldosterona, cortisol); por necesitar oxígeno molecular; y por usar nucleótidos reducidos (NADPH) que se oxidan junto al esteroide.

La irreversibilidad se logra a través de una cadena oxidativa cuyo último eslabón es el citocromo P450, único eslabón de la cadena que puede aprovechar el oxígeno molecular (Figura 1.5).

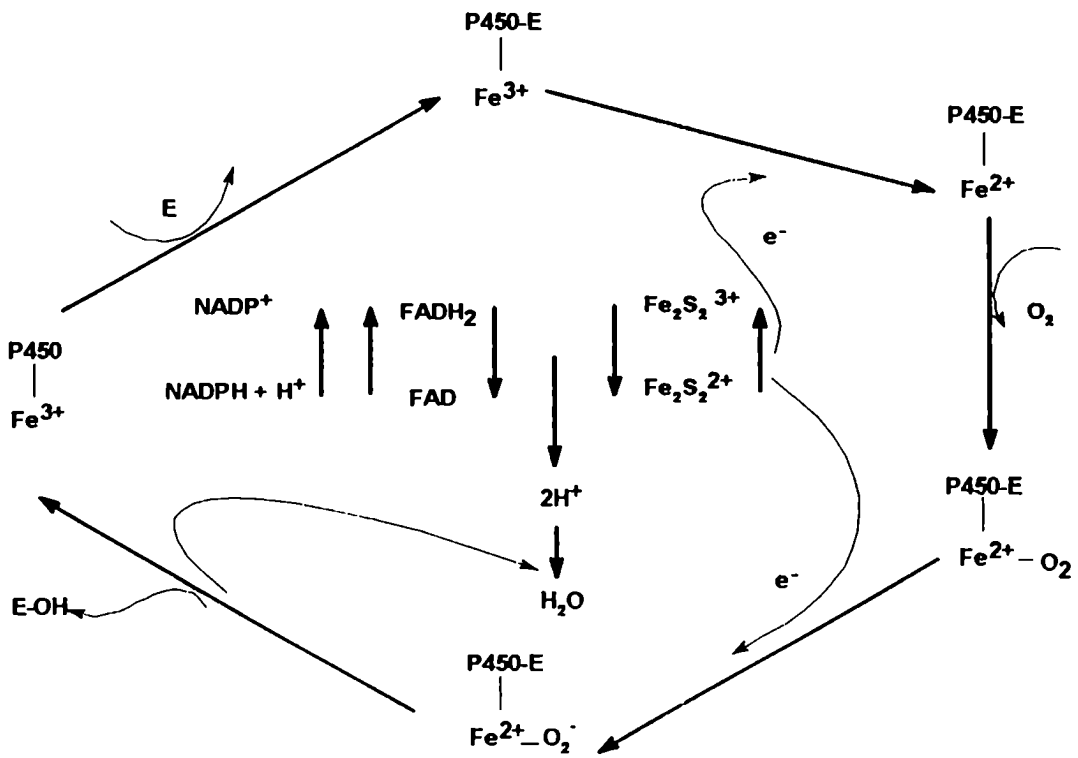


Figura 1.5: Esquema de la cadena hidroxilante del citocromo P450. E: esteroide a hidroxilar; E-OH: esteroide hidroxilado.

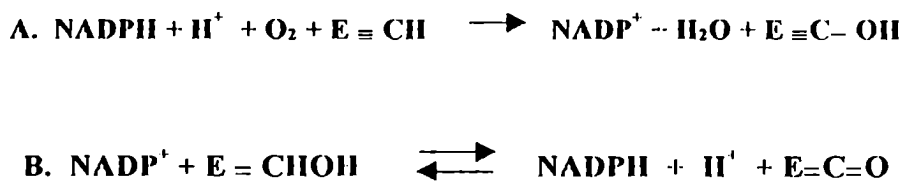


Figura 1.6: Esquema general para las reacciones de hidroxilación irreversible (A) y deshidrogenación reversible (B).

E ≡ CH, núcleo esteroide y su carbono a hidroxilar.

E = CHOH, núcleo esteroide y su carbono a deshidrogenar.

El segundo tipo de oxidación es la deshidrogenación, reacción $NADP^+$ dependiente que, dado el carácter oxidante del co-factor, puede realizarse en medio exento de O_2 (anaeróbico). Son ejemplos típicos la reacción de cortisol a cortisona; de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona (Compuesto A); de testosterona a Δ-4-androstenediona; de estradiol a estrona. La reacción general, se halla representada en la Figura 1.6. Estas reacciones pueden ser reversibles.

En la Figura 1.7 se muestra la secuencia de reacciones más aceptada como la principal para la biosíntesis de aldosterona en la zona glomerulosa adrenal. En ella se muestran todos los pasos

catalizados por enzimas de la familia de los citocromos P450, es decir las consistentes en hidroxilaciones.

La parte que ha resultado más conflictiva para dilucidar fue la correspondiente a las etapas finales de transformación mitocondrial de 11-desoxicorticosterona en aldosterona (paso tardío).

Una parte de la dificultad provino de la existencia de caminos alternativos, complementarios al principal mostrado en la misma Figura 1.7.

1.4 Química de los esteroides 18-hidroxilados

Los esteroides que poseen un grupo oxhidrilo en la posición C-18 tienen la capacidad de reaccionar con grupos carbonilos cercanos, siempre y cuando no exista impedimento estérico que impida esta reacción. Entre los esteroides capaces de tener este tipo de comportamiento se encuentran la 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona y 18-hidroxicorticosterona. Estas moléculas no se encuentran en general en su forma abierta, sino que el grupo oxhidrilo del C-18 reacciona con el grupo carbonilo de la posición C-20 formando de esta manera un hemiacetal, que da origen a una estructura cíclica de mayor estabilidad. Debido a esta estabilidad es que el equilibrio entre las formas cerradas y abiertas se encuentra desplazado hacia la forma cíclica. En esta nueva conformación el puente hemiacetálico está mas expuesto que el oxhidrilo que le dio origen, de manera de hacer que la forma cíclica sea más reactiva y algo más polar.

Dominguez, O.V. (185) y Kondo, E. et al. (26) fueron los primeros en evidenciar la presencia de estas formas en medio ácido, quienes postularon además la presencia de un dímero. Kirk, D.N. (27) además propuso la formación de anhídridos en medio ácido.

Damasco, M.C. y Lantos, C.P. (28) demostraron la precursoriedad de una forma poco polar de 18-hidroxicorticosterona en solución metanólica. Luego Aragonés, A. et al. (29) estudiaron la existencia de diversas formas poco polares.

De todos los esteroides 18-hidroxilados tal vez el más estudiado fue la 18-hidroxicorticosterona. Las soluciones de 18-hidroxicorticosterona en diferentes solventes orgánicos tales como acetona, benceno, cloroformo produce formas menos polares cuya

estructura no es conocida (30). Se postula que la formación de estos compuestos puede deberse a la acidez de las soluciones, a la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno o a la posibilidad de formación de radicales libres.

La 18-hidroxicorticosterona obtenida a partir de corticosterona por biosíntesis microbiológica proviene de una forma dimérica (26) sugiriéndose que dicho dímero estaba formado por dos monómeros unidos por sus grupos funcionales en C-20 y C-21. También esta dimerización fue postulada por Damasco MC y Lantos CP (28) quienes usaron una columna de Sephadex LH-20, luego de mantener al esteroide en solución.

En cuanto a 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona, Genard, P. et al (31) describieron la formación de un dímero de este compuesto en solución metanólica como así también en dimetilsulfóxido.

1.5 Citocromos P450

1.5.1 En General

Hasta ahora hemos hablado de los citocromos P450 pero, qué es un citocromo, a qué se debe su nombre?. Los citocromos constituyen una familia de oxigenasas que usan el oxígeno molecular para producir la oxidación de diversos sustratos los cuales son en gran medida lipofílicos. Pertenecen al grupo de moléculas capaces de insertar uno de los dos átomos de la molécula de oxígeno en el sustrato, por lo cual muchos los han llamado monooxigenasas, y el nombre citocromo se refiere a que pertenecen al grupo de las hemo proteínas (32). En 1958, Garfinkel, D. and Klingenberg, M. separadamente (33;34), descubrieron la presencia de una absorbancia máxima a 450nm cuando trataban microsomas de hígado con monóxido de carbono. Estos descubrimientos

fueron posibles gracias al método espectrofotométrico desarrollado por Chance, B. en 1957 (35) el cual permitía el estudio de muestras turbias por diferencia, esto es, se resta la absorbancia de la muestra sin tratar a aquella absorbancia producida al burbujear en la solución monóxido de carbono. El compuesto responsable de este pico –hasta el momento desconocido- fue llamado pigmento 450, ó P450. En 1957 Ryan, K.J. y Engel, L.L. (36) descubrieron que la 21-esteroide hidroxilación producida en los microsomas de las glándulas adrenales era inhibida por tratamiento con monóxido de carbono. Seis años más tarde Estabrook, R.W. et al. (37) informaron que esta inhibición podía revertirse en presencia de luz dando un pico máximo a 450nm. Este espectro de acción fotoquímica dio una prueba de la necesidad del citocromo P450 en la hidroxilación de esteroides para la síntesis de corticosteroides (38;39). Dos años más tarde, en 1965, Cooper, D.Y. et al. (40) encontraron que el P450 se hallaba involucrado en la hidroxilación de drogas por microsomas hepáticos. Estas observaciones establecieron que el P450 es un componente en los sistemas enzimáticos responsable de la hidroxilación de sustratos lipofílicos y además se encuentra involucrado en reacciones en donde el nuevo compuesto hidroxilado resulta con características más hidrofílicas que originalmente, de manera tal de facilitar su filtración en el riñón evitando así una entrada no específica en las células.

Los citocromos P450 son apoproteínas de 30.000-60.000 Da de peso molecular con un grupo prostético. El hemo está unido a la proteína por un grupo de fuerzas no covalentes que pueden ser removidas por extracción con solvente. La naturaleza de la asociación del grupo hemo con la proteína es importante ya que es responsable de algunas de las características distintivas de los P450s y se cree que son las mismas para todos los citocromos estudiados.

Los citocromos esteroidogénicos pertenecen a dos grandes grupos, citocromos mitocondriales y citocromos microsomales. Los mitocondriales están asociados a la membrana interna de la mitocondria, y si se los solubiliza mediante el agregado de detergentes y se extrae el detergente en cuestión, son solubles en buffer. Estos citocromos necesitan que la transferencia electrónica sea vía adrenodoxina y adrenodoxina reductasa. Estas enzimas están relacionadas con defectos genéticos severos en la biosíntesis de colesterol. Los microsomales, por otro lado, son difíciles de separar de la membrana microsomal y son insolubles en agua. Se agrupan en esta clasificación los citocromos relacionados con la actividad 17α-hidroxilasa y actividad de 21-hidroxilasa (41). Este tipo de comportamiento hidrofóbico sugiere que el sitio activo de la enzima, el cual puede incluir el grupo hemo al que se une el oxígeno como sustrato, toma la forma de un

"bolsillo" hidrofóbico, por lo tanto no debe sorprender que la mayoría de los sustratos utilizados por estas enzimas sean de características hidrofóbicas.

Además debiéramos aclarar que los citocromos esteroidogénicos pertenecen a uno de los diez grandes grupos en que se divide la superfamilia de citocromos P450 (41;42). Si uno compara entre los distintos integrantes de esta gran superfamilia, se puede decir que, Primero: la secuencia de aminoácidos posee una homología $\leq$ a 36% de una familia respecto de las otras nueve. Aquellos citocromos considerados dentro de una misma familia poseen un porcentaje $\geq$68% de similitud con los otros integrantes de la misma familia. Segundo: como el sistema enzimático se encuentra presente en todos los eucariontes y en algunos procariontes la superfamilia puede ser considerada muy antigua y probablemente con una existencia de aproximadamente unos 1.5 billones de años. Tercero: debido a la alta conservación se podría decir que esta superfamilia de citocromos es un ejemplo de una evolución divergente (42).

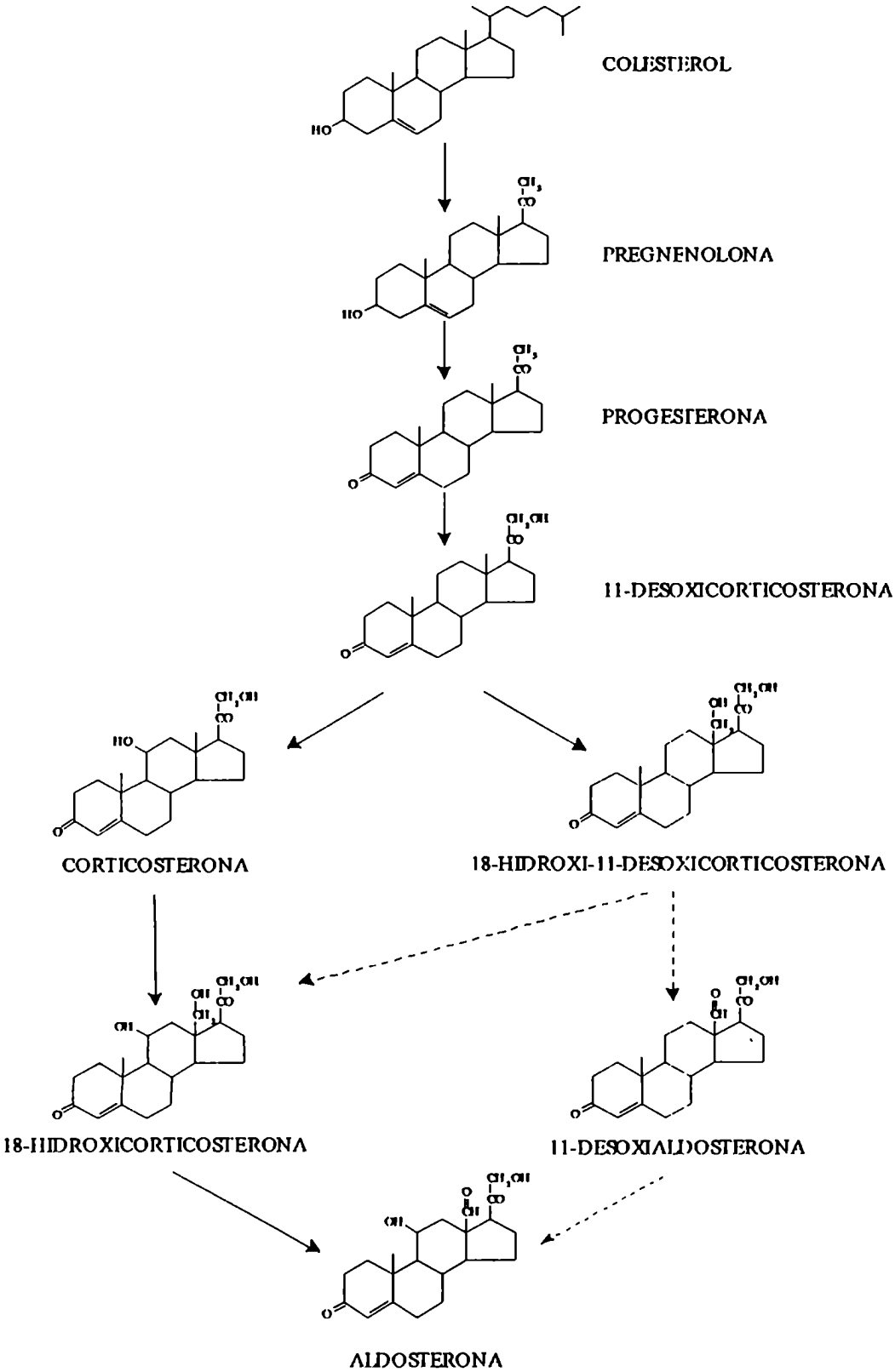


Figura 1.7: Secuencia principal para la formación de aldosterona a partir de colesterol.

1.5.2 En particular

En el caso de las hormonas esteroideas vemos que si comparamos la estructura del colesterol -a partir del cual se sintetizan los diferentes tipos de hormonas esteroideas- con las hormonas sintetizadas, se observa en primera instancia, que existe una ruptura de la cadena lateral, que difieren entre sí en los anillos A y B (un cambio de posición de la doble ligadura $\Delta 5$ a $\Delta 4$) (Figura 1.8) (este último cambio no está relacionado con un citocromo P450) y existen cambios posteriores involucrados con introducciones de grupos oxhidrilos adicionales.

La síntesis de pregnenolona -la precursora para todas las hormonas esteroideas en los vertebrados- requiere NADPH y O_2 (43) indicando que la enzima involucrada posee una función mixta de oxidasa (hidroxilasa) la cual fue descripta por Mason, H.S. en 1957 (44). Al citocromo involucrado en este paso se lo conoce como citocromo que escinde la cadena lateral del colesterol, Citocromo P450scc (scc, "side chain cleavage").

La conversión de pregnenolona a progesterona involucra dos enzimas: una 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y una isomerasa (45;46) La deshidrogenasa utiliza preferencialmente NAD^+ como aceptor de hidrógeno, también puede funcionar con $NADP^+$ trabajando a velocidades mucho más lentas (47;48). El producto de esta reacción es la pregnen 5-ene-3,20 diona. La isomerasa que actúa posteriormente no parece requerir de ninguna coenzima (46).

De los pasos que siguen, es importante señalar que no existen evidencias en cuanto a que los grupos hidroxilos puedan ser removidos en la glándula adrenal. Así es como 17-hidroxipregnenolona es precursor de 11-desoxicortisol y cortisol pero no de 11-desoxicorticosterona (DOC), corticosterona (B) o aldosterona. El precursor de estos tres últimos compuestos en todas las especies es progesterona, la cual es convertida a 11-desoxicorticosterona. Por lo tanto, las hidroxilaciones vía citocromos P450 son escencialmente irreversibles (recordar que las deshidrogenaciones son reversibles).

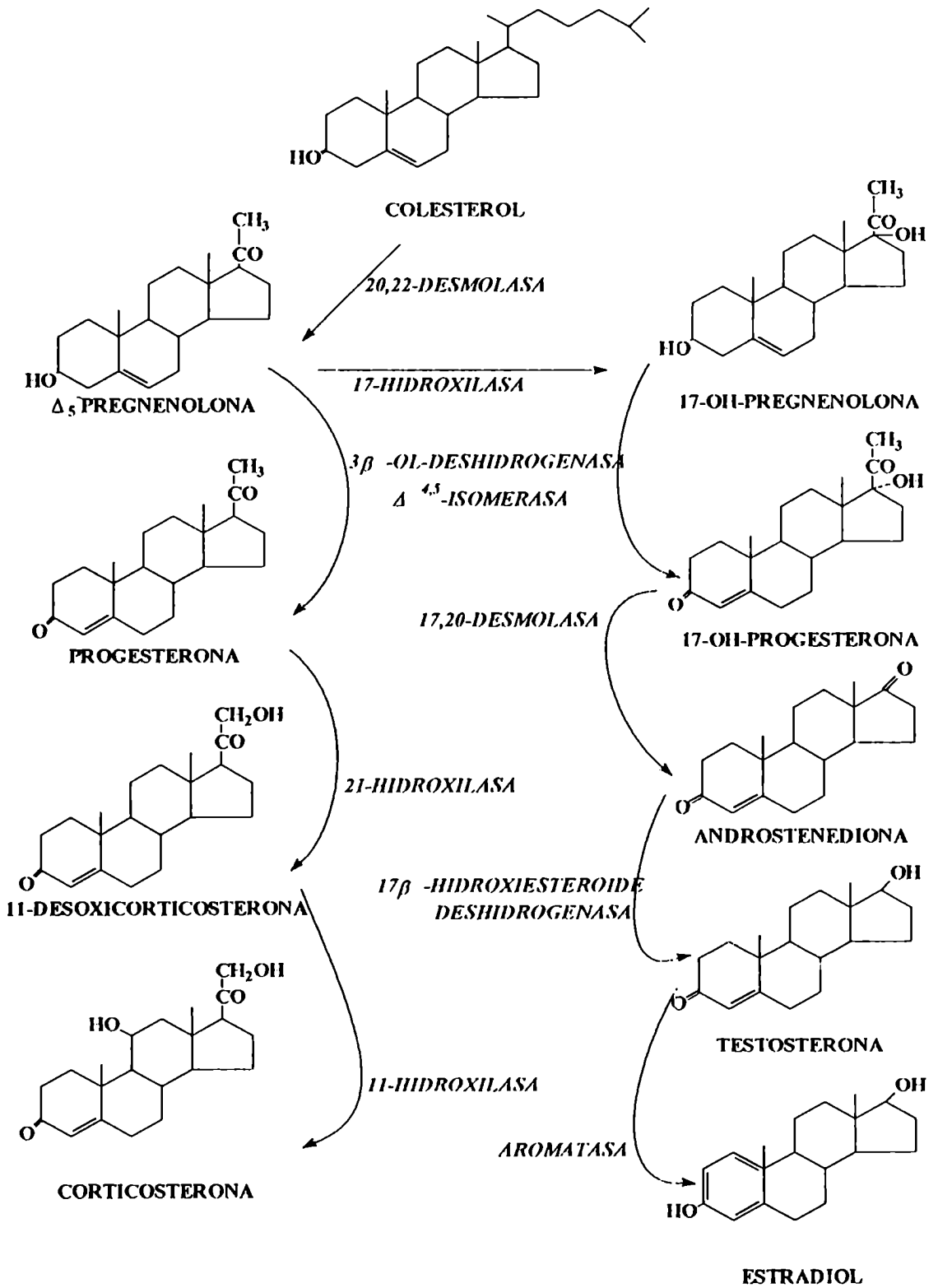


Figura 1.8: Síntesis de glucocorticoides y estrógenos en la glándula adrenal. Se muestran las enzimas involucradas en los pasos indicados.

Tomemos como ejemplo al cortisol, veamos qué cambios ha tenido. Además de cambios en los anillos, ha sufrido la pérdida de parte de la cadena lateral del colesterol (C22-C27) y además ha adquirido tres grupos oxhidrilos (11β, 17α y 21-). Estos cuatro cambios en la molécula requieren cuatro citocromos P450 (Shikita, M. y Hall, P.F., 1973 (49); Omura, T. et al. 1966 (50); Nakajin, S. et al., 1984 (51); Estabrook, R.W. et al. 1963 (37)). Por otro lado, el mineralocorticoide aldosterona, no presenta la hidroxilación en 17α, y muestra un grupo aldehído en el C18 en lugar del grupo metilo de colesterol y esto involucra un nuevo citocromo P450. Se podría resumir entonces que los cambios necesarios a producirse en la estructura del colesterol para la conversión en corticosteroides, andrógenos y estrógenos en el siguiente cuadro (Tabla 1.1):

Actividad	C_i ó anillo del esteroide involucrado
Hidroxilación*	22,20,17α,21,11β,18 (1)
deshidrogenación	3β
ruptura C-C*	20,22 (*)y 17,20(**)(2)
Aromatización*	anillo A (3)
isomerización	$\Delta^{4,5}$

Tabla 1.1: Cambios necesarios requeridos para la conversión de colesterol en corticosteroides, andrógenos y estrógenos. *Requieren citocromos P450 específicos. (*) necesario para pasar de colesterol a C21 esteroides y (**) necesario para obtener andrógenos. **(1)** (36-38;52-57); **(2)** (49;58;59); **(3)** (60;61).

Debiera aclararse aquí que la deshidrogenación requiere una típica deshidrogenasa, (la oxidación en C_{18} hace uso de una enzima diferente) y la isomerización de Δ_5 a Δ_4 requiere una isomerasa, todas enzimas diferentes de P450.

Veamos a continuación qué es lo que ocurre con la aldosterona.

1.6 Los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona

El pasaje de 11-desoxicorticosterona a corticosterona fue siempre aceptado como una hidroxilación en la posición C11 mediada por el citocromo P450 11ß hidroxilasa. Esta enzima se encuentra en la membrana interna mitocondrial (62;63) y es claramente distinta de la enzima encargada de la ruptura de la cadena lateral (Yago, N. et al. 1970 (64)). La enzima es muy inestable (Watanuki, M. et al 1977 (52)). Estudios con células de glándulas adrenales sugieren que la inestabilidad puede deberse a la peroxidación lipídica (Hornsby, P.J. 1980 (65)). Es de hacer notar que el citocromo P450 encargado de la ruptura de la cadena lateral del colesterol es altamente estable respecto del P450 11ß. Esta enzima fue primero purificada de glándulas adrenales de vaca. En vista de estos estudios Bjorkhem, I. y Kalmar, K.E. en 1977 (66) publican que bajo una variedad de condiciones distintas, patológicas y fisiológicas, las actividades de 11 y 18 hidoxilación varían en forma conjunta; estos investigadores sugirieron que una sola enzima podría ser la responsable de las dos actividades. Desde ya la enzima pura podría catalizar ambas hidroxilaciones usando como sustrato 11-desoxicorticosterona (DOC) (67). En 1985 Momoi, K. et al. (68) estudiaron la actividad del citocromo P450 involucrado en estas hidroxilaciones corroborando que trabajando con adrenales de porcinos, cobayos, bovinos y ratas la actividad de 11β-hidroxilación y de 18-hidroxilación sobre DOC es máxima en rata, mientras que la actividad de 11β-hidroxilación sobre 18-hidroxi-11desoxicorticosterona (18OHDOC) es mínima en la misma especie. Esto indicaría que la actividad enzimática para estos sustratos variaría según la especie estudiada. No pasaba lo mismo con la 18-hidroxilación de corticosterona (Watanuki, M. et al. 1978 (69)). El significado funcional de la hidroxilación de DOC hasta ese entonces no quedaba claro, pero dos posibilidades podrían ser consideradas: una postula que la enzima provendría de la zona fasciculata y no estaría relacionada con la síntesis de aldosterona, y la segunda posibilidad se basa en que la enzima hubiese cambiado durante su aislamiento. La primera de las posibilidades daría como consecuencia que una segunda enzima sería la responsable de la hidroxilación de corticosterona en glomerulosa. Ya se había señalado para este entonces que la síntesis principal de aldosterona se produciría vía corticosterona y no vía 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona (camino alternativo) (Figura 1.7) (Ayers, J. et al. 1960 (70), Sheppard, H. et al. 1963 (71)). Sin embargo no existirían dudas de la presencia de 18-OHDOC en fasciculata, parte de la cual sería secretada (Fraser, R. y Lantos, C.P. 1978 (72)).

Por otro lado, para las dos últimas etapas (conversión de corticosterona en aldosterona, Figura 1.9) se postularon 2 enzimas primeramente asignadas a reacciones de 18-hidroxilación (pasaje de corticosterona a 18-hidroxicorticosterona) y 18-deshidrogenación (pasaje de 18-hidroxicorticosterona a aldosterona (72)).

Estas asignaciones parecían obvias al ver las estructuras químicas de los esteroides involucrados. En efecto, la incorporación de un hidroxilo en la posición C18 de corticosterona daría como resultado 18-hidroxicorticosterona y una posterior deshidrogenación de este último esteroide en la misma posición daría lugar a aldosterona (pasaje de alcohol a aldehído en C18).

Sin embargo, mientras que la 18-hidroxilación de corticosterona se mantuvo en el tiempo, las dudas surgieron con respecto a la 18-deshidrogenación dado que, el pasaje de 18-hidroxicorticosterona a aldosterona requería NADPH más que $NADP^+$, aerobiosis más que anaerobiosis y era inhibido por metirapona, un conocido inhibidor de citocromos P450 esteroidogénicos usado también farmacológicamente para casos de hiperaldosteronismo (72). Fue así como por razones estructurales se pensó que una deshidrogenasa era la responsable de la conversión de 18-OHB a ALDO mientras que, por los requerimientos de la reacción, otros investigadores se inclinaban más por una segunda hidroxilación.

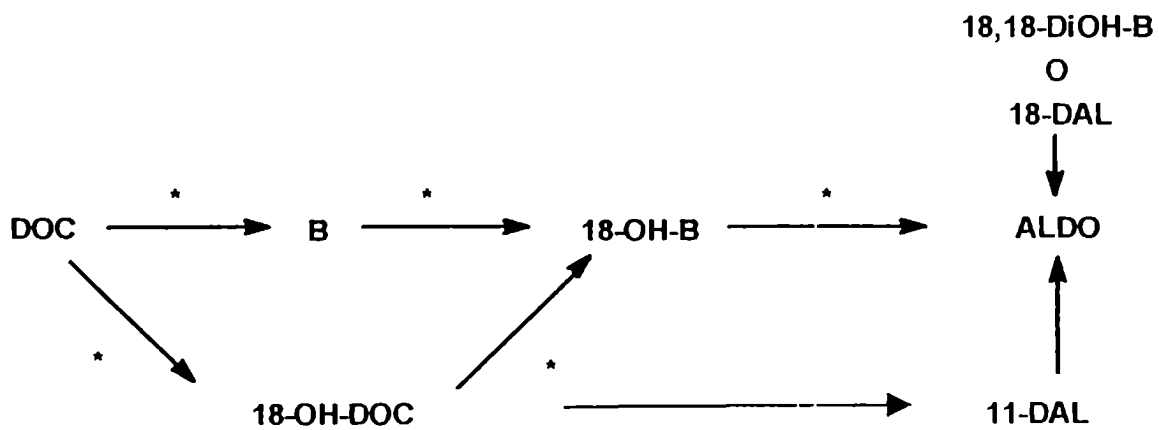
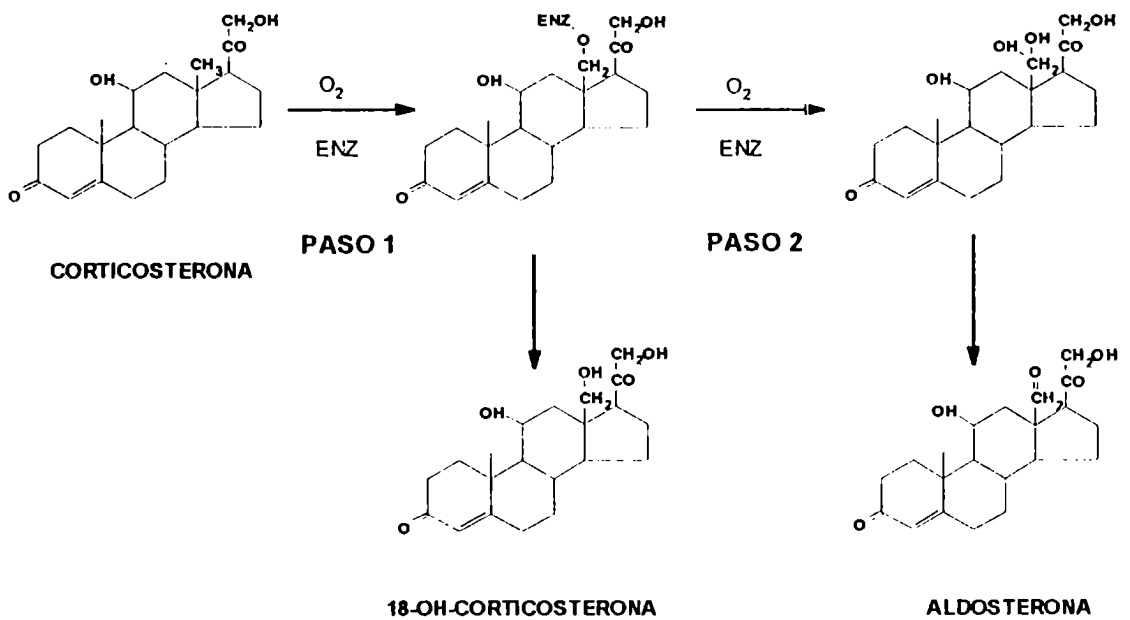


Figura 1.9: Pasos alternativos para la producción de aldosterona a partir de 11-desoxicorticosterona (73). * Pasos comprobados y consistentes en hidroxilaciones catalizadas por Citocromos P450. El resto de los pasos aún no ha sido universalmente aceptado. 18-DAL a ALDO, 11-DAL a ALDO y 18-OHDOC a 11-DAL serían también hidroxilaciones.

De acuerdo a evidencias más recientes (74) (75) la enzima involucrada en el último paso de la biosíntesis posee una función de oxidasa mixta más que de deshidrogenasa. Por lo tanto la conversión de 18-hidroxicorticosterona (18-OHB) a aldosterona (ALDO) más que una deshidrogenación directa podría consistir en una segunda hidroxilación, lo cual conduciría a la formación de un intermediario inestable que se descompondría espontáneamente en aldosterona y agua.

Ante estas evidencias, Ülick, S. (76) propuso usar los más ambiguos términos metiloxidación I y metiloxidación II en reemplazo de los hasta ahí usados para las 18-hidroxilaciones de corticosterona a 18-hidroxicorticosterona y de 18-hidroxicorticosterona a aldosterona, respectivamente. El mecanismo propuesto se muestra en la figura 1.10.



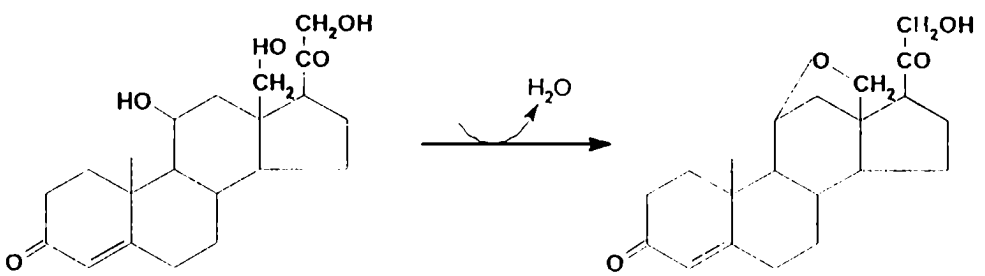
ENZ= Metaloenzima (77)

Figura 1.10: Mecanismo propuesto para la biosíntesis de aldosterona

Posteriormente, quedó bien establecido que todas las reacciones desde 11-desoxicorticosterona hasta aldosterona consisten en hidroxilaciones catalizadas por citocromos P450 (78-81).

El pasaje de 18-hidroxicorticosterona a aldosterona se propone explicar por medio de una segunda hidroxilación en la posición C18 dando lugar a 18,18-dihidroxicorticosterona el cual se deshidrataría para dar aldosterona. Sin embargo, este último esteroide no ha sido aún aislado (Figura 1.9).

Otra hipótesis (82) propone una secuencia inversa, esto es primero una deshidratación de 18-hidroxicorticosterona para dar 11,18-epoxicorticosterona (18-desoxialdosterona, 18-DAL) seguida de una C18 hidroxilación para dar aldosterona. 11,18-epoxicorticosterona ha sido aislada de medios de incubación de cuartos de adrenales de rata (82) (Figura 1.11).



18-OH-CORTICOSTERONA

18-DAL

(18-DESOXIALDOSTERONA)

(11-18 EPOXIALDOSTERONA)

Figura 1.11: Síntesis de 18-DAL a partir de 18-OHB.

Estas dos hipótesis y otras que seguramente surgirán, intentan explicar cómo 18-hidroxicorticosterona pasa a aldosterona por medio de una hidroxilación y no por una deshidrogenación, como se había propuesto inicialmente.

1.7 Aislamiento de los citocromos P450 mitocondriales

En la Figura 1.9 se ve que, alternativamente al paso principal recién discutido, 11-desoxicorticosterona puede también convertirse en aldosterona comenzando por hidroxilarse en la posición C18. Esta hidroxilación y las siguientes necesarias para llegar al mineralocorticoide principal también serían catalizadas por citocromos P450.

De acuerdo a una abrumadora cantidad de evidencia experimental acumulada durante los años '70 (para una revisión ver (83)) surgió el hecho de que una sola enzima es la responsable de la 11ß-hidroxilación y la 18-hidroxilación de 11-desoxicorticosterona en mitocondria adrenal de rata y de vaca. A partir de aquí ha surgido el término citocromo P450 11ß/18-hidroxilasa para referirse a dicho citocromo.

Esta enzima es la encargada de la catálisis de los últimos pasos en la biosíntesis de aldosterona. La 11ß/18 hidroxilasa se encuentra en la membrana interna mitocondrial y como se ha dicho anteriormente es claramente distinta de la enzima encargada de la ruptura de la cadena lateral C_{27}. Esta enzima es un típico citocromo P450, y como cualquier otro citocromo de mitocondria adrenal requiere una flavoproteína y una proteína hierro sulfurada como transportador de electrones. Se vio que esta enzima es muy inestable (Watanuki, M. et al 1978 (69)) y los estudios llevados a cabo con células adrenales sugieren que esta inestabilidad puede deberse a la peroxidación lipídica (Hornsby, P.J., 1980 (65)). Es de hacer notar que la enzima encargada de la escisión de la cadena lateral del colesterol es relativamente estable respecto de esta hidroxilasa.

La enzima fue purificada a partir de adrenal de vaca. Bjckman, I. y Kalman, K.E., 1977 (67) demostraron que bajo diferentes condiciones tanto fisiológicas como patológicas las dos actividades enzimáticas (la 11ß y 18 hidroxilación) variaban en forma conjunta. Fue entonces cuando sugirieron que una sola enzima podía ser la responsable para la catálisis de las dos reacciones. Sin embargo la enzima purificada no catalizaba ambas reacciones a partir de 11-desoxicorticosterona. La enzima tampoco catalizaba la 18-hidroxilación de corticosterona (Watanuki, M. et al. 1978 (69)). La evidencia de que se trate de una sola enzima está relacionada con el hecho que a partir de extractos purificados se obtiene un sólo grupo amino terminal (51), la reacción cruzada con anticuerpos y la inhibición de ambas reacciones por una variedad de sustancias, incluyendo anticuerpos anti-enzima. Además la enzima purificada

contiene un sólo grupo hemo por molécula peptídica. Así es como se parte de la suposición de que se trata de una sola enzima y es como si se utilizase el mismo sitio activo para ambas reacciones, pero esto no fue demostrado por experimentos directos.

Por otro lado la zona fasciculata contiene gran cantidad de 18-OHDOC parte de la cual es secretada (Fraser, R. y Lantos, C.P. 1978 (72)). No se conoce el significado fisiológico de esta secreción aunque se sabe que es un mineralocorticoide débil. Pero la enzima aislada por Watanuki et al. en 1977 catalizaba ambas reacciones a partir de DOC en zona fasciculata. También podría suponerse que exista cierto tipo de regulación que haga que cuando la enzima se encuentra aislada de la mitocondria su especificidad cambie. La situación se complicó aun más cuando se descubrió que esta enzima aislada de adrenal bovino también podía hidroxilar al C19 (Momoi, K. et al. 1983 (68)).

A fines de la década del '70 y principios de la del '80, varios grupos de investigadores reportaron que bajo ciertos tratamientos hormonales lograban estimular la conversión de corticosterona a aldosterona sin afectar la de 11-desoxicorticosterona a corticosterona, y viceversa.

Estos resultados llevaron a que en 1983, Hornsby, P.J. y Crivello, J.F. (84) propusiesen una enzima citocromo $P450_{CMO}$ (corticosterona metiloxidasa) que convertiría corticosterona en aldosterona y que sería diferente al citocromo 11ß/18-hidroxilasa.

Las teorías acerca de una enzima específica para la producción de aldosterona fueron aparentemente invalidadas ante la observación de que preparaciones purificadas y reconstituidas de citocromo $P450_{11B}$ bovino o porcino, extraídos de células de zona glomerulosa y fasciculata, eran capaces de catalizar la conversión de los dos pasos de corticosterona a aldosterona (85). Durante la purificación de esta enzima, se encontró que no existía actividad de producción de aldosterona en fracciones mitocondriales que no contenían actividad de 11ß-Hidroxilasa y concluyeron que el citocromo $P450_{11B}$ era la única enzima capaz de sintetizar aldosterona en estas glándulas (85).

En 1986 Lombardo, A. et al. (86) usaron citocromo $P450_{11B}$ purificado y lo integraron a liposomas artificiales, pudiendo demostrar así que este citocromo estaría inserto en la membrana liposomal por medio de un dominio polipeptídico, el cuál contendría el sitio catalítico de la enzima. Por otro lado, la fosforilación por una kinasa dependiente de AMPcíclico (PKA) tiene lugar sobre un residuo de serina de un dominio que permanece accesible desde fuera de las vesículas lipídicas (86).

En el mismo año Hamamoto, I. et al. (87) publican una distribución zonal de los

citocromos P450 (P450scc, $P450_{11\beta}$, $P450_{c21}$ y b5) aislados de adrenales bovinas, utilizando determinaciones basadas en técnicas de "Western Blot" con antisueros (a partir de conejos y pollo) contra estos citocromos. Encontraron que las cantidades de citocromo P450 reductasa (dependiente de NADPH) y de citocromo B5 por miligramo de proteínas eran mayores en la zona glomerulosa que en otras zonas; mientras que las otras enzimas estudiadas (P450scc, P450(11)beta, P450s21) poseían niveles mayores en la zona fasciculata

En 1987 Lauber, M. et al. (88) dan la evidencia de dos formas diferentes del citocromo $P450_{11\beta}$ en glándulas adrenales de rata. Si trabajaban con glándulas de ratas a las cuales se las había privado de sodio y a la vez, si se había enriquecido la dieta en potasio, lograban estimular la producción de 18-hidroxicorticosterona y aldosterona a partir de corticosterona (89-92). De esta forma incrementaban la actividad de biosíntesis en zona glomerulosa. Usando un anticuerpo monoclonal (Mab 258 (93)) anticitocromo $P450_{11\beta}$ se encontró que reaccionaba en forma cruzada con una fracción proteínica mitocondrial a partir de material aislado de humanos, cerdos, conejos, cobayos y ratas. Estas bandas aparecieron entre 51 y 49 KDa.

Hasta ese momento las hipótesis que se manejaban, eran las que se encuentran representadas en la Figura 1.12

Dos años más tarde se publica (94) la purificación y caracterización de dos formas distintas de citocromo $P450_{11\beta}$. La forma de 51 KDa fue aislada de zona fasciculata y la de 49Kda de zona glomerulosa mitocondrial siempre usando ratas a las cuales se les suministró una dieta alta en potasio y baja en sodio. Se observó que bajo este tratamiento la desaparición de la banda de 51KDa coincide con la aparición de la banda de 49KDa. Estos resultados sugerirían un mecanismo de procesamiento postranslacional convirtiendo a la proteína de 51KDa en una forma más pequeña de 49KDa. De todas formas, no se descartaba que la proteína de 49 KDa podría ser codificada por un gen diferente, regulado separadamente dependiendo de las condiciones fisiológicas

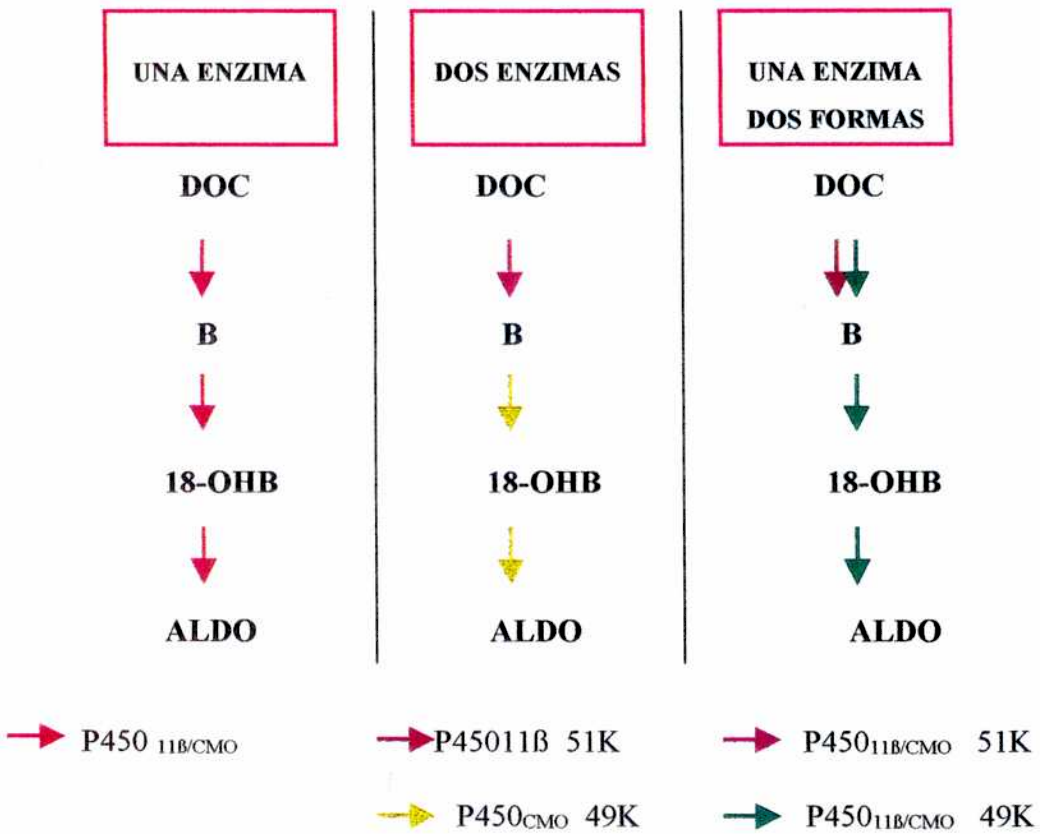


Figura 1.12: Tres hipótesis diferentes acerca de la enzima involucrada en el camino biosintético desde 11-desoxicorticosterona (DOC) hasta aldosterona (ALDO) (88).

Hoy se sabe que existen en la corteza adrenal bovina dos isoenzimas, citocromos P450 diferentes codificados por dos genes diferentes que han sido clonados, secuenciados sus cDNAs y purificadas las proteínas correspondientes de pesos moleculares 49.500 y 48.500. En un sistema enzimático reconstituido, ambas proteínas convierten deoxicorticosterona en corticosterona, 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona, 18-hidroxicorticosterona y aldosterona. Dado que se encontraron cantidades semejantes de ambas isoenzimas en todas las zonas de la corteza adrenal y ambas poseen actividades catalíticas similares "in vitro", la especificidad de la zona glomerulosa para la producción de aldosterona en glándula adrenal bovina puede ser explicada ya sea por diferentes actividades catalíticas "in vivo" o por la distribución zonal de las dos formas de dicho citocromo. En la zona fasciculata, la supresión selectiva de la actividad biosintética de aldosterona inherente a

ambas formas de la enzima podría ser debida a factores locales todavía desconocidos. Entre éstos, los más firmes candidatos parecen ser el ambiente lipídico y la concentración de agentes antioxidantes naturales. También en el terreno de las hipótesis, otros factores mitocondriales desconocidos podrían adaptar la actividad biosintética para aldosterona de las dos enzimas en la zona glomerulosa al sodio corporal y a la cantidad de potasio.

La situación es completamente diferente en la glándula adrenal de rata. A diferencia de lo que ocurre en la vaca, ni extractos mitocondriales solubilizados y reconstituidos ni preparaciones de citocromos P45011ß purificados, ambos de zona fasciculata, convierten 11-desoxicorticosterona en 18-hidroxicorticosterona y aldosterona. La biosíntesis de aldosterona está restringida a preparaciones de mitocondrias de zona glomerulosa y es debida a a presencia de un segundo tipo de citocromo P450 que tiene actividad catalítica para metiloxidaciones de tipo 1 y 2. Este citocromo se denomina citocromo P450-aldosterona sintasa (Cit P450-aldo). Los citocromo $P450_{11ß}$ y P450-aldo de zona glomerulosa de adrenal de rata poseen alta homología (83%) en su secuencia de aminoácidos pero también diferencias suficientes que demostrarían que las dos proteínas están codificadas por dos genes diferentes.

Los pesos moleculares de los dos tipos de citocromos P450 (de aquel que no produce aldosterona y del que la produce) de adrenal de rata resultaron ser de 54.608 y 54.273, respectivamente.

Estudios más rigurosos han demostrado que el citocromo P450-aldo también tiene actividad de citocromo $P450_{11ß}$ pero mucha menor que el citocromo $P450_{11ß}$ propiamente dicho. Esto ha dado lugar a que ambos citocromos se denominen isoenzimas CYP11B1 y CYP11B2 de la familia de citocromos P45011ß. La existencia de estos dos citocromos $P450_{11ß}$ con diferentes actividades catalíticas explica completamente la especificidad de la zona glomerulosa para la secreción de aldosterona en la glándula adrenal de rata.

La expresión del gen que codifica a la enzima productora de aldosterona (CYP11B2) aparece como característico de células de zona glomerulosa y no de células de la zona interna. En efecto, de acuerdo a estudios recientes con técnicas de hibridización "in situ", el gen transcripto de la 11ß-hidroxilasa CYP11B1, (no productora de aldosterona) fue localizado en todas las células endócrinas de la corteza adrenal, mientras que el de aldosterona sintetasa (CYP11B2, (95)) sólo se encontró en células de zona glomerulosa.

Estos últimos resultados han sido recientemente puestos a consideración debido a dos

trabajos que sostienen que CYP11B1 está restringido a zona fasciculata (96;97). Además entre ambas zonas, glomerulosa y fasciculata, no existiría ni CYP11B1 ni CYP11B2 (98)

Grandes diferencias en la región flanqueante a 5' de los genes que codifican para los dos tipos de enzimas indican que dos sistemas de control separados regulan su transcripción (99). En ratas no-preñadas, el tratamiento con dexametasona decrece selectivamente el nivel de mRNA que codifica para la enzima no productora de aldosterona (100). Por otro lado, el mRNA para la forma productora de aldosterona es incrementado en respuesta a la restricción de sodio.

Dos citocromos $P450_{11\beta}$ diferentes, isoenzimas con actividades catalíticas similares a aquellos dos tipos de citocromos $P450_{11\beta}$ de rata con alta homología, y codificados por dos genes diferentes (CYP11B1 y CYP11B2) existen también en adrenales de humanos (101) y en ratón (102).

Ambos genes han sido localizados en el cromosoma 8 en el humano y en el quince en el ratón, respectivamente. Células de zona glomerulosa de ratón en contraste con células de la misma zona de rata expresan solamente la enzima del tipo productora de aldosterona, mientras que la expresión del tipo no productor de aldosterona está restringida a las zonas internas de la corteza adrenal. En rata y en humanos, la variabilidad del gen CYP11B2 y su control por estimuladores específicos e inhibidores, probablemente juega un papel fisiológico importante en el sentido de dar variabilidad a la respuesta de secreción de aldosterona frente a un dado estimulador, y en la dependencia de esta respuesta con respecto a la ingesta de sodio y potasio.

La importancia clínica de la existencia de dos tipos diferentes de citocromo $P450_{11\beta}$ está mostrada en un informe en donde una forma quimérica de la 11ß-hidroxilasa/aldosterona sintasa puede causar un síndrome de hiperaldosteronismo remediable por glucocorticoides (103).

Por lo dicho hasta aquí parecería claro admitir que las dos etapas para la conversión de corticosterona en aldosterona son catalizadas por una única enzima, el citocromo P450-aldo. Sin embargo quedan varios hechos que no son total o satisfactoriamente explicados por este modelo. Entre ellos podemos destacar que mientras aldosterona es un esteroide exclusivo de la zona glomerulosa, 18-hidroxicorticosterona (intermediario entre corticosterona y aldosterona) es principalmente producido por dicha zona adrenal pero también se biosintetiza en zona fasciculata. Por otro lado en el defecto CMO de tipo II (102), varios autores hallaron que aldosterona estaba disminuída y 18-hidroxicorticosterona anormalmente aumentada.

Más estudios serán requeridos para dilucidar completamente el camino biosintético de

aldosterona. De todos modos en 30 años de investigaciones los modelos enzimológicos para la producción de aldosterona han ido variando enormemente, y probablemente lo sigan haciendo por algún tiempo más.

Dado que CYP11B1 y CYP11B2 tienen alta homología y sus genes se hallan en tandem en el cromosoma 8q22, las mutaciones producidas en el gen de CYP11B2 y recombinaciones genéticas entre éste y el gen de CYP11B1 serían las responsables de las alteraciones en la enzimología de la producción de aldosterona, dando una nueva denominación y explicación a las deficiencias anteriormente conocidas como de CMOI y CMOII.

1.8 Síntesis de aldosterona en otras especies

La biosíntesis de aldosterona ha sido muy estudiada en rata y ratón pero no sucedió lo mismo en otros roedores. En particular poco se sabe sobre la enzimología para aldosterona en la vizcacha.

Este mamífero (roedor) resulta particularmente interesante dado que:

- La vizcacha adulta presenta cambios en la actividad de la glándula pineal durante fotoperíodos estacionales (104).

- El tamaño de los testículos varía según la época del año estudiada llegando a un mínimo durante el mes de agosto el cual coincide con un pequeño período de hibernación (105).

- Por otro lado también se observan cambios histológicos relacionados con estos períodos estacionales. Por ejemplo durante el verano y el otoño los túbulos seminíferos poseen un diámetro mayor y los espermatozoides se encuentran en el lumen. Las células intersticiales muestran un citoplasma voluminoso y núcleos redondeados. En el comienzo de la primavera se observan signos histológicos de recuperación del funcionamiento gonadal; el cual permanece inactivo durante los meses de julio y agosto. Estos últimos cambios están relacionados con una reducción gradual de los tubos seminíferos y una ausencia de espermatozoides (105).

Cabría entonces preguntarse si estos cambios alcanzan también a la glándula adrenal, la cual cumpliría un rol relevante durante la hibernación y los distintos fotoperíodos.

El ión litio es utilizado en experimentos de señalización intracelular por su acción inhibidora de la enzima inositol fosfato-fosfatasa lo cual lleva al mantenimiento de los niveles de los inositoles fosfato IP1,IP2 e IP3 producidos por la activación de la fosfolipasa C sobre fosfatidilinositol (PI) y sus derivados difosfatados y monofosfatados (PIP2 y PIP). Esta acción del ión litio ha llevado a utilizar al ión con fines farmacológicos en ciertos estados psicopatológicos (106).

Por último, la hidrólisis de fosfatidilinositoles y la consecuente formación de inositoles fosfato es uno de los principales mecanismos por los que se modula la capacidad esteroidegénica adrenal (107;108). Se ha observado que en células perfundidas la producción de aldosterona fue inhibida por Li^+ cuando las células fueron estimuladas con angiotensina II (109).

Por otra parte se sabe que en los tratamientos con el ion litio varios órganos de la vizcacha resultan mucho más sensibles a dosis bajas, mientras que a estas concentraciones no se observan daño en la rata (110).

1.9 Aldosteronismo

1.9.1 Aldosteronismo primario

La producción de ALDO por la zona glomerulosa de la glándula adrenal está regulada por varios sistemas, entre ellos el formado por renina y angiotensina, pero además por la endotelina y, en forma aguda, por ACTH.

Dado que la aldosterona es el mineralocorticoide natural más potente, los niveles altos de aldosterona (aldosteronismo) van en general acompañados con cuadros de hipertensión, entre moderada y severa, e hipocalemia (111) (a menudo precipitada por una dieta rica en sal), a través de su efecto sodiorretentor. Cuando los niveles altos de aldosterona se deben a la existencia de niveles altos de angiotensina II (Ang II), se habla de aldosteronismo secundario (en el sentido que la aldosterona aumenta como un efecto secundario al aumento de Ang II). Los tratamientos, en este caso, consisten en inhibir la producción de Ang II, en general a través de la inhibición de la enzima de conversión que es la encargada de producir Ang II a

partir de Angiotensina I (Ang I).

En cambio, cuando no son evidentes las causas del aumento de aldosterona, o sea cuando se produce excesiva secreción de ALDO sin aumento en la producción de los estimuladores conocidos del mineralocorticoide, se habla de un aldosteronismo primario (111;112). En estos casos el tratamiento consiste en inhibir a las enzimas encargadas de producir aldosterona, CYP11B2 y/o citocromo P450 SCC, usando metirapona, aminoglutetimida, etc.

Las causas más comunes de aldosteronismo primario son (113) los adenomas adrenales (113), la hiperplasia bilateral de la zona glomerulosa y, en menor grado, los carcinomas adrenales. La hiperplasia adrenal unilateral también puede producir aldosteronismo primario, aunque es muy poco común (114).

Aldosteronismo suprimible por glucocorticoides

El aldosteronismo suprimible por glucocorticoides es una forma rara de aldosteronismo primario. En estos pacientes la supresión de la secreción de ACTH por administración de dexametasona corrige, en general, la hipertensión y el exceso en la producción de ALDO.

Sin embargo, en algunos de estos pacientes, la administración de glucocorticoides disminuye los niveles de ALDO pero la hipertensión sólo es corregida en forma parcial. La existencia de este cuadro llevó a la búsqueda de alguna otra sustancia como responsable del aumento de la presión arterial. El grupo de Gomez-Sánchez, C.E. (115) encontró, en la orina de estos pacientes, niveles elevados de 18-oxocortisol y 18-hidroxicortisol, esteroides a los que se le encontraron propiedades hipertensinogénicas (116;117). La producción de 18-oxocortisol es debida a la acción de la enzima que cataliza la transformación de corticosterona (B) en ALDO (reacción que normalmente ocurre en la zona glomerulosa) sobre el cortisol (esteroide natural de la zona fasciculata) (118;119).

En efecto, si se comparan las estructuras de B y ALDO con las del cortisol (F) y la de 18-oxocortisol respectivamente (Figura 1.13), se halla que la única diferencia estructural es la presencia, en los dos últimos esteroides, de un grupo OH en la posición C17. En otras

palabras, la enzima CYP11B2 (que cataliza el pasaje de B a ALDO) produce, sobre el cortisol, las mismas reacciones en la posición C_{18} que sobre B para dar ALDO, obteniéndose así 18-oxocortisol. Los intermediarios 18-OHB y 18-OHF (18-hidroxicortisol), también fueron caracterizados.

Bajo este modelo, entonces, debe ocurrir que el cortisol de la zona fasciculata deba encontrarse con la enzima CYP11B2, la cual está restringida a la zona glomerulosa, para poder ser transformado en 18-oxocortisol. Este encuentro no es obvio dada la diferente zonación de cortisol y de la enzima CYP11B2. El modelo más aceptado para explicar estos hechos se basa en la existencia de la zona adrenal de transición entre la zona glomerulosa y la zona fasciculata. Cuando las células de la zona glomerulosa migran centrípetamente para formar la zona fasciculata pierden la capacidad de producir ALDO y adquieren la de formar cortisol. Entre ambas zonas adrenales quedaría otra con "mezcla" de células de ambas que se ha dado en llamar zona de transición. En ella hay, juntas, células que producen cortisol (de la zona fasciculata) y otras que pueden sintetizar ALDO (de la zona glomerulosa) haciendo así posible que el cortisol sea transformado en 18-oxocortisol (118;119).

En algunos pacientes esta zona de transición sería patológicamente grande obteniéndose así elevados niveles de 18-oxocortisol (115). Sin embargo, estudios más recientes parecen indicar que en la intersección entre ambas zonas adrenales no se halla la enzima CYP11B2 (98) (ni tampoco la enzima CYP11B1) lo que no apoyaría el modelo propuesto. La aparente controversia debe aún ser resuelta.

Paralelamente, también podría suceder que la capacidad de sintetizar ALDO de la enzima CYP11B2 de las células de la zona glomerulosa no desaparezca cuando dichas células sufren su migración centrípeta para dar las células de la zona fasciculata. La presencia inusual de la enzima CYP11B2 en la zona fasciculata y su acción sobre el cortisol daría como resultado una nueva opción para el encuentro entre el cortisol y la enzima CYP11B2, produciéndose la secreción de cantidades excesivas de 18-oxocortisol.

Por último, más recientemente, se ha postulado que una recombinación genética podría ser la responsable del cuadro esteroideo de esta patología (ver más adelante).

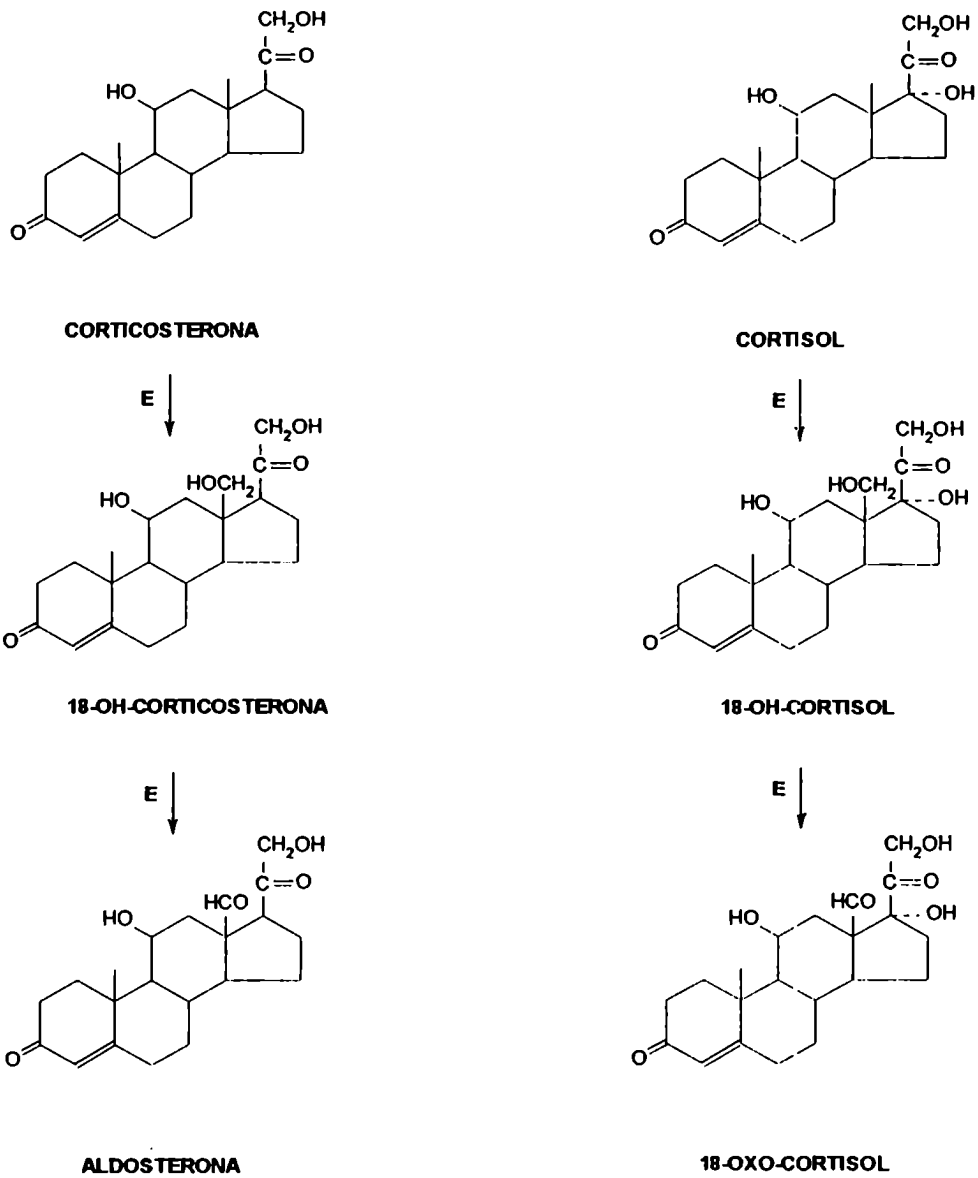


Figura 1.13: Conversión de corticosterona en aldosterona y de cortisol en 18-oxocortisol. En ambos caminos la única diferencia es la ausencia o presencia, respectivamente de un oxhidrilo en la posición C_{17}.

Análisis de laboratorio

Los análisis de laboratorio están dirigidos primero a diagnosticar el aldosteronismo primario y luego a la clasificación del tipo específico.

La obtención de un nivel alto de aldosterona y una baja actividad o normal de renina en plasma determina el diagnóstico de aldosteronismo primario. Alternativamente, la medición de la baja actividad de renina puede ser reemplazada por la determinación de ALDO antes y después de la administración de una carga salina (mayor que 150 mmol/día: por ejemplo, infusión de 2 litros de solución fisiológica). Si el nivel alto de ALDO no disminuye por la alta ingesta de sodio, se confirma el aldosteronismo primario.

La buena diferenciación entre los distintos tipos de aldosteronismo primario es necesaria para la correcta elección del tratamiento. Sin embargo no existe un método único para distinguirlos. La tomografía computada o la resonancia magnética de imágenes es útil en la diferenciación entre los adenomas adrenales y la hiperplasia de la zona glomerulosa. Sin embargo, existen falsos negativos cuando los adenomas tienen un tamaño menor que el límite de resolución.

La postura vertical actúa como una condición estimulatoria para la producción de Ang II y, a través de ella, para la producción de ALDO. Por otro lado, las glándulas adrenales de pacientes con hiperplasia de la zona glomerulosa son más sensibles a la acción de la Angiotensina II que las de los pacientes con adenomas. Por lo tanto, luego de cuatro horas de condición ambulatoria, los niveles de la aldosterona son mayores en los pacientes con hiperplasia que en aquellos con adenoma y, obviamente, éstos últimos aún mayores que los de las personas normales.

Otro procedimiento útil consiste en la determinación de los niveles plasmáticos de ciertos esteroides. La 18-hidroxicorticosterona (18-OHB), como ya se dijo, es un intermediario de la última etapa mitocondrial consistente en la transformación de 11-desoxicorticosterona en aldosterona (120). Los niveles plasmáticos de 18-OHB son mayores en pacientes con adenomas que en pacientes con hiperplasia de la zona glomerulosa.

Como ya se ha mencionado, el 18-oxocortisol es el análogo 17-hidroxilado de la aldosterona (Figura 1.13). Este esteroide presenta niveles plasmáticos altos en pacientes con adenomas adrenales y con aldosteronismo suprimible por glucocorticoides. En pacientes con

hiperplasia de la zona glomerulosa los niveles son normales. Sin embargo todavía no existe disponibilidad comercial de los elementos necesarios para realizar el ensayo de 18-oxocortisol.

Finalmente la información acerca de la existencia o no de una hiperplasia adrenal se puede obtener infundiendo ACTH y tomando muestras de las venas adrenales (derecha e izquierda) previamente cateterizadas. En cada muestra se mide el cortisol presente (como testigo de una correcta cateterización) y aldosterona (como medida de la hiperplasia de la zona glomerulosa). Adicionalmente este método permitiría la diferenciación entre hiperplasia unilateral y la bilateral.

1.10 Producciones de aldosterona y cortisol: recombinación genética y mutaciones.

La 17α-hidroxilasa (CYP17) es la enzima responsable de catalizar la introducción de un grupo oxhidrilo (OH) en la posición C_{17} de los esteroides, y por lo tanto indispensable para la producción del cortisol, un 17α-hidroxiesteroide.

La limitación de la expresión de CYP17 en la zona fasciculata y CYP11B2 en la zona glomerulosa da como resultado la zonación para la síntesis de cortisol y aldosterona, respectivamente.

En la zona fasciculata, 11-desoxicortisol (el análogo 17α-hidroxilado de 11-desoxicorticosterona) es hidroxilado en la posición 11ß por la enzima CYP11B1 para producir cortisol (121). En la zona glomerulosa, donde la actividad de 17α-hidroxilasa está suprimida, CYP11B2 produce aldosterona mediante una 11ß-hidroxilación, 18-hidroxilación y 18-oxidación secuenciales de DOC. Las dos enzimas poseen un 93 % de similitud en su secuencia de amino ácidos, difiriendo sólo en 36 residuos aminoacídicos. La actividad adicional de 18-hidroxilación y 18- oxidación que tiene la enzima CYP11B2 está presuntamente relacionada a la presencia de algún fragmento de estos 36 aminoácidos que distinguen a dicha enzima. La localización y naturaleza de las secuencias regulatorias que resultan en la expresión específica en la zona glomerulosa del gen del CYP11B2 no fue aún identificada pero se asume que está en la región 5' del intrón 2 (122). Esta región incluiría la secuencia que suprime la expresión de CYP11B2 en la zona fasciculata, o que activa la

expresión en la zona glomerulosa, por interacción con moléculas regulatorias de las respectivas zonas. Ambos genes CYP11B están localizados en tandem en el cromosoma 8q22 a una distancia aproximada de 40kb.

En el paso temprano (120) del camino biosintético de aldosterona, el gen de la 21 hidroxilasa (CYP21), enzima que cataliza la conversión de progesterona en 11-desoxicorticosterona, y un pseudo gen (CYP21P) también se encuentran en un ordenamiento en tandem que recuerda el de los dos genes CYP11B. Muchas de las mutaciones encontradas en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa son el resultado de una recombinación entre el gen activo y el pseudo gen. Este mecanismo es, en los casos de deficiencias de actividad de 21-hidroxilasa, uno de los desórdenes monogénicos más comunes, ya que la recombinación resulta en una pérdida parcial o total de la función enzimática.

Entonces, podrían esperarse recombinaciones genéticas entre el gen CYP11B1 y el gen CYP11B2 (en este caso ambos genes son funcionales) que produzcan una importante modificación dando lugar a genes que codifican para enzimas con nuevas actividades o con actividades regulatorias inapropiadas.

Por ejemplo, la fusión del extremo 5' del gen CYP11B1 al extremo 3' del gen CYP11B2, da como resultado una inapropiada regulación de la producción de la aldosterona. Esta situación ha sido descripta como un hiperaldosteronismo suprimible por glucocorticoides (ver más arriba).

Las mutaciones puntuales en los genes de CYP11B que han sido descriptas, conducen a desórdenes de la síntesis de los esteroides (Tabla 1.2).

DEFECTOS GENETICOS	CAUSA
Deficiencia de 11ß-hidroxilasa	Mutaciones en CYP11B1
Deficiencia de aldosterona sintetasa	
Tipo I Sin actividad	{CMO I}
Tipo II (deficiencia de 18-hidroxilasa)	{CMO II}
Tipo III (Deficiencia de 18-oxidasa)	Mutaciones en CYP11B2
Hiperaldosteronismo suprimible por glucocorticoides	Recombinaciones entre CYP11B1 y CYP11B2

Nota: Entre llaves se muestran cuales deficiencias corresponden a la denominación anterior: CMO I CMO II, para más información ver el texto.

Tabla 1.2: Alteraciones enzimáticas en la biosíntesis de aldosterona

Mutaciones en el gen CYP11B1, que codifican para una enzima no-funcional, fueron encontradas en pacientes con deficiencia de 11ß-hidroxilasa (123;124), mientras que en pacientes con deficiencias de aldosterona sintetasa se encontraron mutaciones en el gen de la CYP11B2 (125;126). No se ha descripto hasta el momento un punto específico de mutación que afecte a la regulación de la síntesis de la aldosterona o el cortisol.

1.10.1 Deficiencia de 11ß-hidroxilasa

Ambos citocromos CYP11B1 y CYP11B2 poseen actividad de 11ß-hidroxilasa, aunque solamente el citocromo CYP11B1 está expresado en la zona fasciculata, donde es

sintetizado el cortisol. Mutaciones en este gen causan una deficiencia de la actividad de 11ß-hidroxilasa, con un consecuente descenso en los niveles del cortisol, subsecuente estimulación de la corteza adrenal por ACTH, hiperplasia de la glándula adrenal y acumulación de precursores. Como una parte significativa de la producción de estos precursores es utilizada normalmente en la biosíntesis de andrógenos, la acumulación de ellos da como resultado una *virilización* de las hembras, un prematuro cierre de las epífises, y baja estatura en ambos sexos. Por otro lado, la sobre-producción de DOC (precursor y mineralocorticoide) y sus metabolitos llevan a hipertensión arterial.

Mientras que mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones fueron encontradas para todos los casos de deficiencia de 11ß-hidroxilasa, la estrategia usual de *amplificación* de exones por PCR y secuenciamiento del DNA amplificado puede dar error (por pérdida) en la determinación de cromosomas recombinantes. Por lo tanto no es inusual que la secuenciación de los exones de un paciente con deficiencia de 11ß-hidroxilasa por este método no evidencie la mutación que produjo esta deficiencia. Consecuentemente, los cromosomas recombinantes pueden estar presentes como un componente heterocigota. En principio, la deficiencia puede resultar de un reemplazo de la región regulatoria del gen CYP11B1 por aquellas del gen CYP11B2 o por deleción del gen CYP11B1. Estos cromosomas recombinantes pueden también ser difíciles o imposibles de detectar por un análisis usual por "Southern blot".

1.10.2 Deficiencia de aldosterona sintetasa

La clasificación de las alteraciones de esta enzima presenta históricamente algunas dificultades debido a suposiciones incorrectas acerca de la bioquímica básica de la biosíntesis de la aldosterona (ver (120)). Estas alteraciones fueron primeramente clasificadas como deficiencias de CMOI y CMOII (127;128) ya que se creía que estaban relacionadas con los dos últimos pasos de la biosíntesis de la aldosterona (120).

El aumento del conocimiento por estudios recientes sobre que la función y expresión del gen CYP11B1 y del gen CYP11B2 conduce a un acercamiento más racional de clasificación de estas alteraciones. Los fenotipos observados serían el resultado de deficiencias en CYP11B2 más la acción del CYP11B1, el cual tiene actividad de 11ß-hidroxilasa y débil de

18-hidroxilasa. Consecuentemente la variación en los niveles de los precursores esteroidogénicos de aldosterona no necesariamente refleja la actividad que es afectada. Esto marca la gran diferencia de criterio entre lo realizado en las décadas del '60 y '70, y los estudios recientes.

En principio existirían tres tipos de deficiencia de la enzima, los cuales corresponden a cada una de las tres actividades de dicha enzima, a saber 11ß-hidroxilasa, 18-hidroxilasa y aldosintetasa.

La deficiencia de CMOI, la cual se creyó era causada por un defecto en el paso de 18-hidroxilación en la síntesis de aldosterona, sería en realidad debida a mutaciones que destruyen todas las actividades de la enzima CYP11B2. Por lo tanto la biosíntesis de la aldosterona está totalmente bloqueada y los niveles altos de los precursores y en particular de la corticosterona son el resultado de la actividad de la enzima CYP11B1 (tal vez sobreestimulada). La deficiencia en la aldosterona sintetasa de tipo I sería el término más correcto para esta deficiencia en CMOI.

De forma similar, la deficiencia en CMOII se creyó primeramente que correspondía a una falla de la 18-oxidación. Ahora se han encontrado mutaciones en los genes del CYP11B2 en pacientes con CMOII, que permitían la 11ß- hidroxilación pero no la 18-hidroxilación. Presumiblemente los niveles altos de 18-OHB que fueron encontrados en esta enfermedad sean un reflejo de la conversión de 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona (18-OHDOC) por la actividad de 11ß-hidroxilasa del CYP11B2, sumado a la directa contribución del CYP11B1. La deficiencia en CMOII sería entonces mejor clasificada como una deficiencia de la aldosterona sintetasa de tipo 2. Una deficiencia de este tipo puede ser causada por una mutación que resulte de un reemplazo de una parte del gen CYP11B2 que codifica para la región responsable de la actividad sintética de la aldosterona, por la correspondiente secuencia para el gen CYP11B1.

Por último, si bien serían posibles las mutaciones que afecten específicamente la 18-oxidación (aldosintetasa), los mismos no han sido aún descriptos.

De esta forma se ha trazado un breve panorama que intenta explicar, con los antiguos aportes de la enzimología clásica y los más recientes de la biología molecular, las alteraciones que ocurren en la enzimología de la producción de esteroides en la corteza adrenal, con mayor énfasis en el paso tardío de la biosíntesis de aldosterona.

1.11 Inhibidores suicidas

El estudio de los inhibidores suicidas muchas veces está relacionado con fines terapéuticos.

El citocromo P450 responsable de la hidroxilación del metilo en posición C-19 de los andrógenos (aromatasa) y el citocromo P450 responsable de la hidroxilación del metilo en posición C-18 de corticosterona (aldosterona sintasa) fueron tomados como referencia para el estudio de inhibiciones suicidas en la síntesis de esteroides. Ambas son enzimas terminales del camino biosintético. Dado que la hipersecreción de las hormonas respectivas, estrógenos y aldosterona, están asociadas con condiciones específicas de enfermedad se ha estudiado la acción de estos inhibidores en los caminos metabólicos respectivos (129). Para ello se han utilizado sustratos análogos conteniendo grupos vinilos, etinilos, o nitrilos que se unen a estos grupos metilos C-19 o C-18 (130;131). En algunos casos se han utilizados inhibidores de pasos anteriores a los descriptos como la 18-etinilprogesterona (132) o la 18-vinilprogesterona (133), ambos potentes inhibidores de la síntesis de aldosterona.

1.12 Planteo del trabajo

El presente trabajo tendrá por objeto elucidar algunos aspectos fundamentales relacionados con los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona.

i) En primer lugar se deberán establecer las condiciones óptimas de trabajo para la medición de las actividades enzimáticas involucradas en estos pasos. Los principales parámetros a tener en cuenta son entre otros, buffer a utilizar, efecto de cationes divalentes, cantidad de enzima, tiempo de incubación, etc.

ii) Se probarán diferentes esteroides como inhibidores del paso tardío de la biosíntesis de aldosterona. El objetivo buscado es encontrar alguno que inhiba selectivamente alguno de estos pasos dejando los otros sin alterar, pudiendo así demostrar la existencia de más de una enzima en el

camino biosintético de aldosterona. Se probará entre otros con cortisol ya que este esteroide se sabe que puede ser transformado -en la zona glomerulosa de adrenales de vaca- en 18-oxocortisol usando las enzimas aldosterogénicas. Cortisol usa las misma reacciones que corticosterona en su pasaje a aldosterona (76;119).

Los experimentos se basarán en la medición de la transformación de distintos sustratos a aldosterona y sus intermediarios, usando diferentes esteroides como posibles inhibidores. Las incubaciones se realizarán usando mitocondrias de glándula adrenal de rata como fuente enzimática. En el caso de utilizar sustratos radioinertes las determinaciones cuantitativas se realizarán por RIA. En caso de que el sustrato sea radioactivo, las determinaciones se realizarán por medición de la radioactividad presente luego de la separación y purificación por HPLC del esteroide en estudio.

iii) En todos estos experimentos en donde se produzca una inhibición en la biosíntesis de aldosterona se deberá medir la relación corticosterona a 18-hidroxi-11desoxicorticosterona. El objetivo de este estudio es encontrar situaciones en donde dicha relación varíe, como una evidencia indirecta de la posibilidad de regulación de las actividades de 11βhidroxilación y 18 hidroxilación de CYP11B1 y CYP11B2 sobre DOC.

iv) Con fines comparativos se realizarán experimentos similares a los anteriores pero en adrenales de otra especie tal como vizcacha.

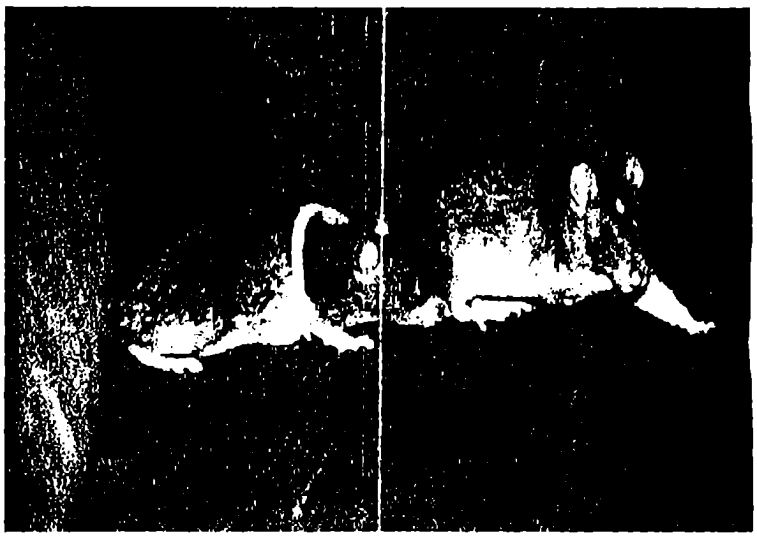
v) Se estudiará el tipo de inhibición realizada por aquellos esteroides que hayan probado tener efecto como inhibidores de la biosíntesis de aldosterona. Para ello se realizarán gráficos de Lineweaver-Burk.

vi) Desarrollo de un modelo matemático simple para el cálculo de constantes cinéticas de sustratos suicidas basado en un modelo experimental donde la concentración de enzima catalíticamente activa se mantenga constante.

vii) Consecuentemente estudiar inhibiciones suicidas en cuanto a su acción sobre el paso tardío mitocondrial de la biosíntesis de aldosterona (DOC → ALDO), calculando sus constantes cinéticas. La determinación de estas constantes permitirá clasificarlos por su potencia y obtener evidencias indirectas sobre la identidad de las enzimas involucradas en cada reacción de la biosíntesis de aldosterona. El criterio a seguir será: constantes cinéticas diferentes para etapas diferentes indicarían enzimas diferentes.

viii) Estudio químico estructural sobre la transformación de 18-OHB en 18-DAL. Como ya se ha indicado en la introducción esta relación ha sido postulada en nuestro grupo de

trabajo como de naturaleza espontánea y parte de un camino alternativo de la biosíntesis de aldosterona. Se propone estudiar la reacción determinando la estructura de los intermediarios, un posible mecanismo molecular, y las características del medio en el cual ocurre. Con este fin se utilizarán técnicas de MS-FAB (espectroscopía de masa por Fast Atom Bombardment).



DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Materiales y métodos**
- **Condiciones de incubación:**

  descripción y resultados.

Capítulo 2Diseño experimental

MATERIALES Y METODOS

2.1 Estrategias y consideraciones en el trabajo con citocromos P-450

En el trabajo experimental con proteínas y en particular con enzimas uno generalmente se asombra del tiempo que demanda encontrar toda la información necesaria para conocer las condiciones bajo las cuales se debe realizar la preparación de la fuente enzimática y más especificamente las incubaciones para la medición de velocidades y/o de tasas de conversión. No existe una fórmula general para el trabajo con proteínas, pero por supuesto que la primer fuente de la información requerida es la bibliografía existente. Luego se deberán realizar las adecuaciones y verificaciones experimentales que permitan establecer las condiciones definitivas. Entre las condiciones a establecer está la cantidad de material con la cual debo trabajar; el tipo de buffer a utilizar en las incubaciones; el agregado de otras sustancias al medio de incubación, de forma tal de estabilizar a la enzima, la temperatura de trabajo; tiempo de la incubación, etc.

En este caso la enzima a utilizar –Citocromo P450 esteroidogénico de mitocondria adrenal- proviene de ratas machos. Todos los citocromos P450 mitocondriales, como ya se ha dicho, necesitan de la presencia y acción de otras proteínas que conforman la cadena de transporte de equivalentes de reducción desde el NADPH hasta el oxígeno (Ver Figura 1.5). Estas proteínas son la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa. La primera es soluble en la matriz mitocondrial mientras que la adrenodoxina reductasa es de membrana interna mitocondrial. Por lo tanto, si por extrusión de las mitocondrias durante su aislamiento se pierde adrenodoxina, la actividad enzimática del citocromo P450 que se

pretende medir bajará considerablemente. Esto podría ser corroborado por preincubaciones realizadas antes de medir la actividad enzimática(Ver Resultados).

Por otro lado, los citocromos P450 esteroidogénicos son sensibles a oxidación por lo que es necesario colocar antioxidantes para preservar su actividad enzimática (134). Todo esto lleva a una situación de inestabilidad tal que en incubaciones de enzima pura es necesario agregar citocromo P450 continuamente (20).

Veamos entonces qué consideraciones se realizaron para el trabajo con los citocromos P-450.

2.2 Preparación de la fuente enzimática. Metodología standard de trabajo.

Se utilizaron ratas machos CHBBThom de 200 a 250 grs de peso, las cuales fueron aportadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron sacrificados por decapitación luego de lo cual se extrajeron rápidamente las glándulas suprarrenales colocándolas en solución salina de NaCl 0,9%. Se les retiró el tejido graso y conectivo que las rodea y en algunos casos se las utilizó tal cual y en otros se extrajo la cápsula para su posterior tratamiento. Todos estos pasos fueron realizados a una temperatura de 4°C; manteniendo todas las soluciones en baño de hielo-agua. Se procedió luego a su homogeinización usando un homogeinizador de Potter-émbolo, del tipo teflón-vidrio, en buffer Krebs Ringer bicarbonato-glucosa (135;136), cuya composición consta en la Tabla 2.1

SOLUCION	SUSTANCIA	CONC. (%)	CONC. (M)	MOLARIDAD FINAL	RELACION
A	NaCl	0.9	0.154	0.118	25
B	KCl	1.15	0.154	0.0047	1
C	KPO_4H_2	2.11	0.154	0.0018	0.25
D	$SO_4Mg.7H_2O$	0.38	0.154	0.0018	0.25
E	$NaCO_3H$	1.29	0.154	0.0254	5.25
F	$CaCl_2$	1.22	0.11	0.0254	0.75
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$			0.01	

Tabla 2.1: Composición del buffer Krebs Ringer Bicarbonato Glucosa.
El pH de trabajo fue 7.4

Una vez obtenido el homogenato se realizó su fraccionamiento subcelular, siguiendo el protocolo de centrifugación diferencial usado por Cozza et al. (76). Por lo tanto, se procedió a centrifugar al homogenato a 11.000 g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó nuevamente buffer y se procedió a una nueva centrifugación de 11000 g durante 10 minutos. El precipitado final se tomó como la fracción de las mitocondrias de las glándulas suprarrenales ya que contuvo la máxima cantidad del marcador mitocondrial succinato deshidrogenasa (73-79%). Para las incubaciones se utilizó el mismo buffer pero con un agregado de propilenglicol (no más del 20% v/v), de manera de ayudar a la solubilización de los esteroides que se usaron como sustrato. Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. La reacción se inició por agregado de 0.5mM de NADPH como cofactor y las incubaciones

se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C; el volumen final de incubación fue de 500µl.

2.3 Solubilización de los precursores de aldosterona

Los esteroides utilizados se encuentran solubilizados en solventes orgánicos incompatibles con la presencia enzimática, por lo tanto se debe evaporar el solvente antes del agregado de las mitocondrias. Este procedimiento se realizó en atmósfera de N_2, a temperatura ambiente, para evitar de esta forma la posible oxidación de los precursores. Una vez realizada esta operación se agregó la fracción de las mitocondrias en el buffer de incubación antes descripto y se realizó una preincubación de 15 minutos antes del agregado de NADPH.

2.4 Tratamiento de los incubados

Una vez finalizado el tiempo de incubación requerido para cada experimento, se trató a los incubados de la siguiente manera:

i) Si el objetivo del experimento era determinar la cantidad de esteroide presente en el sistema de incubación por HPLC, se procedió de la siguiente manera: Se extrajeron los diferentes productos de la incubación con Cl_2CH_2, dos veces con 2 ml cada vez. Se juntaron los dos extractos en un tubo de vidrio y se evaporó bajo atmósfera de N_2, a temperatura ambiente, hasta sequedad. Se resuspendieron los productos en 100µl de CH_3OH y se procedió a sembrarlos (en punto) en placa de TLC con indicador de fluorescencia. Se lavó cada tubo dos veces con Cl_2CH_2 (100µl) para así disminuir las pérdidas. Se corrió la placa con una mezcla conteniendo Cl_2CH_2 : CH_3OH : CH_3CN (86:7:7) como fase móvil. Luego de una

corrida de aproximadamente 75 minutos se detuvo el desarrollo de la cromatografía, extrayendo la placa de la cuba y revelando la misma por exposición a la luz UV. Cuando se trató de productos radioactivos la localización de las zonas radioactivas se realizó con un radiocromatógrafo de scaneado marca Packard Modelo 7201.

Una vez determinada la zona a estudiar se levantó la sílica de dicho sector mediante raspado y se eluyó colocando la sílica con el esteroide en pequeñas columnitas de plástico rellenas con lana de vidrio. El solvente de elución utilizado fue Cl_2CH_2 : CH_3OH (95 : 5). Se utilizaron aproximadamente 3 ml de esta mezcla para cada columnita, luego se evaporó el solvente y se redisolvió el residuo conteniendo al esteroide en estudio en 100µl de CH_3OH. Una vez llegado a esta etapa se procedió a inyectar esta solución o, una alícuota de la misma, en un equipo HPLC.

ii) Si el objetivo del experimento era determinar la cantidad de esteroide por estudio de radioinmunoensayo (RIA) se procedió de la siguiente manera: Se centrifugaron las distintas incubaciones a 11.000g durante 10 minutos, a 4°C, de forma de quedarse con el sobrenadante y trabajar así con alícuotas del mismo para la determinación cuantitativa del esteroide por radioinmunoensayo. El método de radioinmunoensayo será explicado con mayor detalle más adelante.

2.5 Determinación de esteroides por HPLC

Una vez aislado el esteroide como se detalló en el párrafo anterior se procedió a inyectarlo en un equipo HPLC Spectraphysics, compuesto por bomba de inyección Spectra Series P100, detector Spectra Series UV100 e integrador Data Jet SP 4600 de Spectraphysics. Se utilizó una columna de fase reversa (µ-Bondapak C18) con la mezcla CH_3OH H_2O (3:2) utilizada como fase móvil. El flujo al cual se trabajó fue de 0,8 ml/min. con una presión de trabajo de aproximadamente 1.800 psi. La determinación de los tiempos de retención para cada esteroide fue fundamental para la caracterización cualitativa del mismo. La Figura 2.1 muestra una corrida cromatográfica con los tiempos

de retención característicos para cada esteroide, bajo nuestras condiciones experimentales.

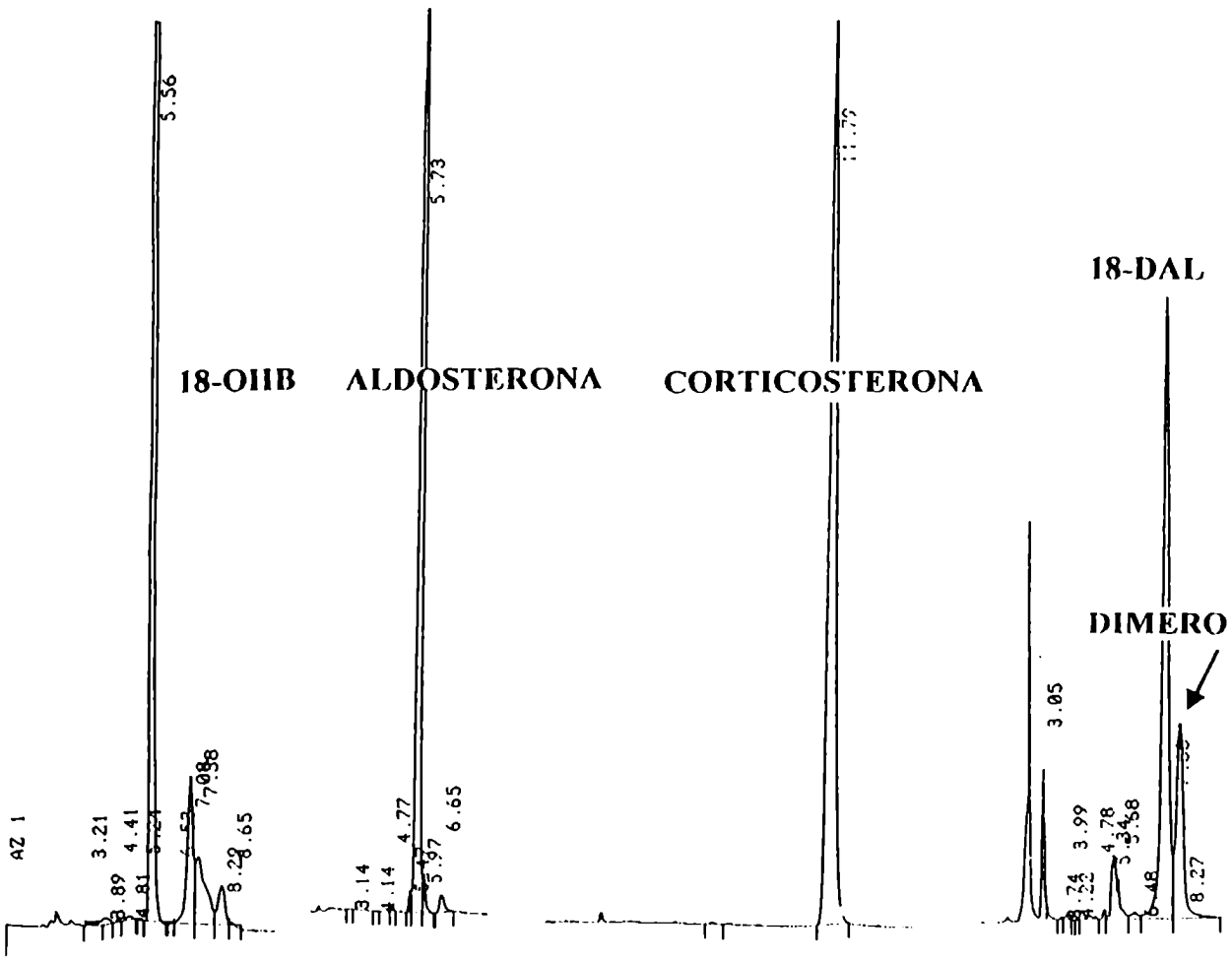


Figura 2.1: Cromatograma obtenido al correr diferentes esteroides en HPLC usando como solvente de corrida el sistema CH_3OH : H_2O (3:2) con un flujo de 0.8 ml/min. a una presión de 1800 psi, con columna μ-Bondapak C18.

2.6 Cuantificación de esteroides por HPLC

2.6.1 De esteroides no radioactivos

Para la cuantificación de los esteroides presentes en cada pico se realizó una curva de calibración con el mismo esteroide a determinar, siempre y cuando fuese posible. Si no fuese posible entonces la curva de calibración se realizó con un esteroide que tuviese un tiempo de retención similar al del esteroide a cuantificar dado que en estos esteroides el grupo cromóforo es el mismo. La curva de calibración relacionó masa del compuesto con el área del pico de HPLC. El área del pico obtenido por cromatografía de alta presión fue calculada por un integrador Data Jet SP 4600 de Spectraphysics por el método MN=0, descripto en el manual del usuario del equipo en la sección 3. Se muestra a continuación –a modo de ejemplo- una curva de calibración para corticosterona, dando el algoritmo matemático que relaciona la masa de la sustancia con el área del pico hallado por HPLC (Figura 2.2).

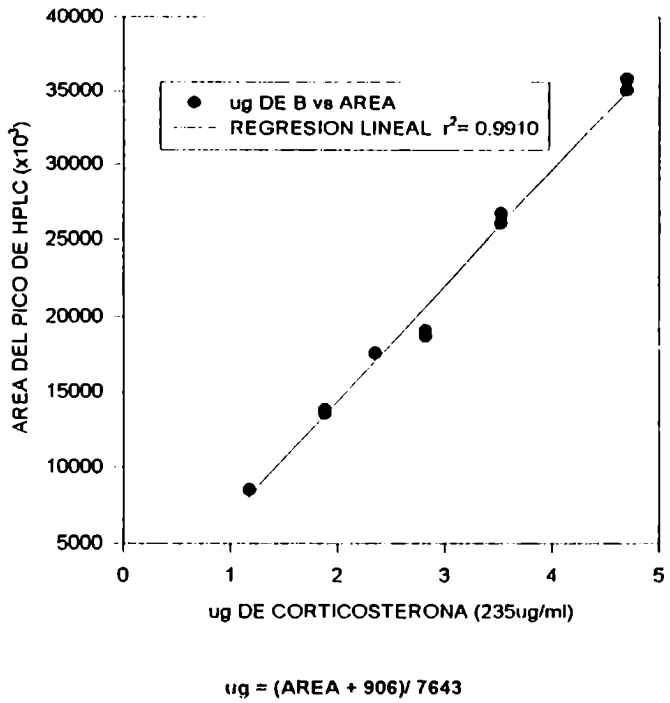


Figura 2.2: Curva de calibración para corticosterona, usando como método de cuantificación el área determinada por el integrador Spectra Physics del HPLC.

Según esta técnica de cuantificación con HPLC se determinaron los siguientes esteroides: aldosterona, corticosterona, 18-desoxialdosterona, dímero de 18-desoxialdosterona y 18-hidroxicorticosterona.

2.6.2 De esteroides radioactivos.

Para la cuantificación de los esteroides radioactivos presentes en cada muestra se inyectó en el HPLC la muestra conjuntamente con el esteroide no radioactivo, el cual se quería cuantificar. Primero se realizó una valoración del tiempo de retención del compuesto a medir, para posteriormente en una segunda inyección en el equipo de alta presión, proceder a colectar alícuotas de 0,3ml. A estas fracciones se les agregó líquido

de centelleo para poder contar la radioactividad presente en la muestra. Se estudió entonces si la radioactividad presente coincidía con el pico del mismo compuesto no radioactivo y si esto ocurría, entonces se podría estimar las cuentas pertenecientes al compuesto en estudio. En la Figura 2.3 se muestra un perfil de elución para aldosterona no radioactiva y para aldosterona tritiada luego del conteo de radioactividad de las fracciones de elución.

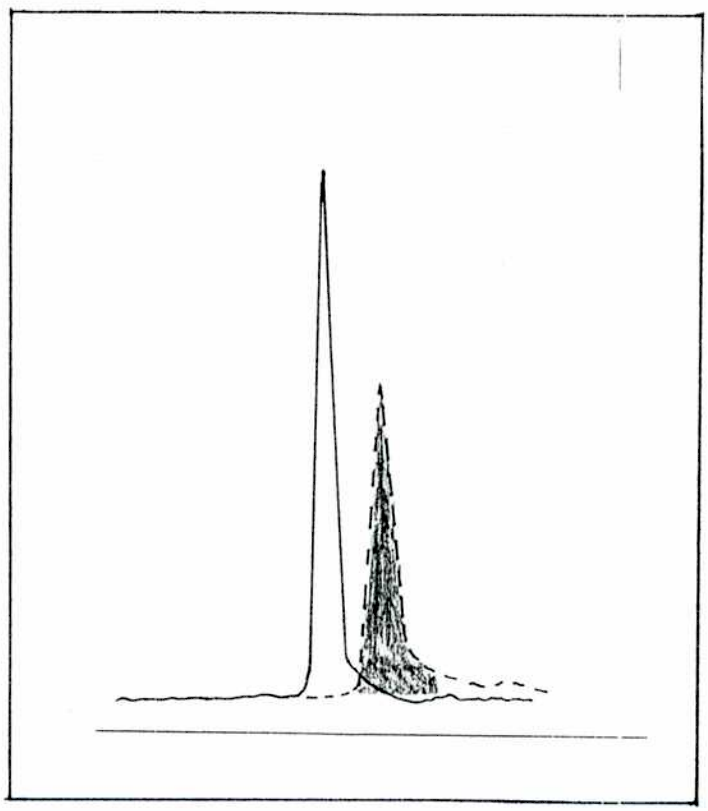


Figura 2.3: Esquema de recolección del esteroide purificado por HPLC.
— aldosterona no radioactiva; ----- aldosterona tritiada. En la figura se muestra el pico de elución detectado a 254nm correspondiente al esteroide no radioactivo y un pico construído a partir de los datos obtenidos al contar alícuotas de las diferentes fracciones. El área grisácea corresponde a las fracciones recuperadas.

2.7 Determinación cuantitativa de esteroides radioinertes por RIA

Para cuantificar los esteroides radioinertes, aldosterona y corticosterona, se utilizó la técnica de radioinmuno ensayo (137;138).

La reacción fue llevada a cabo en tubos de Kahn de polipropileno. Cada tubo de la reacción contuvo 200µl (volumen final total) de buffer 0.1M H_3BO_3, de pH=8; 1% de la fracción V de seroalbumina bovina; 0.2% de inmunoglobulina G; una cantidad predeterminada de anticuerpo antiesteroide; una cantidad radioactiva del esteroide a cuantificar (aproximadamente 5000 dpm) y una dada cantidad del mismo esteroide radioinerte, ya sea standard o proveniente de la muestra bajo estudio.

Para la determinación cuantitativa de un determinado esteroide fue necesario la confección de una curva de calibración a partir de soluciones standard del esteroide a cuantificar preparadas con buffer H_3BO_3 0.1M de pH=8, conteniendo 5% de CH_3CH_2OH.

La preparación de las soluciones standard para poder construir la curva de calibración se realizó a partir de diferentes diluciones de una misma solución madre.

El protocolo general consistió en pipetear 10µl de cada una de las soluciones standard –para la curva de calibración- ó 10µl de la muestra incógnita. Luego se agregó el esteroide marcado (^{3}H-esteroide) en una cantidad aproximada a los 5000 dpm y el anticuerpo específico del esteroide en cuestión, todo disuelto en 200µl del buffer. Para poder cuantificar la unión inespecífica se incubó el marcador ^{3}H-esteroide en ausencia de anticuerpo y en ausencia de esteroide radioinerte.

La reacción se dejó transcurrir durante aproximadamente 16 horas a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo la reacción se detuvo por el agregado de una solución fría de $(NH_4)_2SO_4$ saturado al 75%. Se procedió entonces al centrifugado de los tubos a 6.000 rpm durante 20 minutos en centrífuga refrigerada (4°C). Las cuentas totales se calcularon a partir de tubos preparados igual que para el conteo inespecífico pero sin realizar la centrifugación de los mismos. Los sobrenadantes conteniendo al esteroide radioactivo no unido al anticuerpo, se volcaron a viales para su posterior conteo, agregando para ello 2.5ml de líquido de centelleo (Tolueno + 0.4% de PPO + 0.025% de dimetil-POPOP).

Los viales se agitaron vigorosamente para facilitar la extracción del esteroide radioactivo a la fase orgánica. Finalmente se contó la radioactividad presente en un contador de centelleo líquido, Wallac, modelo 1214 Rackbeta.

La dispersión intra e interensayo fue menor del 10%.

2.8 Determinación de aldosterona.

La curva de calibración para aldosterona se construyó con una serie de tubos conteniendo cantidades crecientes de aldosterona no radioactiva que abarcó un rango desde 0 pg hasta 100 pg. La hormona radioactiva D-(1,2-^{3}H (N))-ALDO poseía una actividad específica igual a AE=52.00 Ci/mmol.

El anticuerpo monoclonal usado se obtuvo a partir de un hibridoma de ratón (137), siendo el título del mismo 1/3000.

2.9 Determinación de corticosterona

La curva de calibración para corticosterona se construyó con una serie de tubos conteniendo cantidades crecientes de corticosterona no radioactiva que abarcó un rango desde 0 pg hasta 1000 pg. La hormona radioactiva D-(1,2-^{3}H (N))-B poseía una actividad específica igual a AE=(50.00-60.00) Ci/mmol.

El anticuerpo policlonal usado se obtuvo a partir de suero de oveja (138), siendo el título del mismo 1/4000.

2.10 Cálculo de la masa del esteroide en estudio.

Una vez obtenidos los datos de esteroide libre (en cpm) se deben hallar los valores de esteroide unido al anticuerpo (en cpm) los cuales serán transformados a valores de

masa de esteroide mediante un programa de computación (139) que ajusta los valores obtenidos de la curva de calibración, a una función matemática de cuatro parámetros fijos.

Dicho programa calcula los valores de *A*, *B*, *C* y *D* por iteración:

$$Unido = \frac{A - D}{1 + \frac{Masa * B}{C}} + D$$

Siendo *A* 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 obtenidos estos parámetros, se determina la masa incógnita del esteroide despejando la misma de la ecuación anteriormente hallada.

Cuando se trate de datos correspondientes a incubaciones realizadas a partir de mitocondrias de glándulas adrenales los datos se expresarán como masa de esteroide/mg de proteína ó masa de esteroide/masa adrenal. Las proteínas de las fuentes enzimáticas se determinaron por el método de Bradford, M.M. (140).

2.11 Determinación del Título del anticuerpo.

Se detallará aquí la determinación del título del anticuerpo antialdosterona; de manera similar se procedió para hallar el título del anticuerpo anticorticosterona. Se prepararon distintas soluciones con concentraciones crecientes de anticuerpo antialdosterona usando como solvente de dilución buffer borato 0.1M, a pH=8, conteniendo 5% de etanol. Las diluciones abarcaron un rango de 1/100 a 1/10.000. A cada tubo se le adicionó el marcador radioactivo (5.000 dpm), disuelto en el buffer descripto anteriormente en la determinación por RIA. El procedimiento se desarrolló de manera similar a la descripta en la misma sección, de manera de determinar el esteroide unido al anticuerpo. Se trazaron curvas de esteroide unido específicamente al anticuerpo

en función de la dilución de anticuerpo utilizada (Figura 2.4). Se elige como título del anticuerpo aquella dilución que permita la formación de complejo aldosterona-anticuerpo equivalente al (40-60)% del esteroide total agregado, el cual en este caso es de 5.000 dpm. Las diluciones elegidas para los anticuerpos de aldosterona y de corticosterona fueron de 1/3.000 y 4.000 respectivamente.

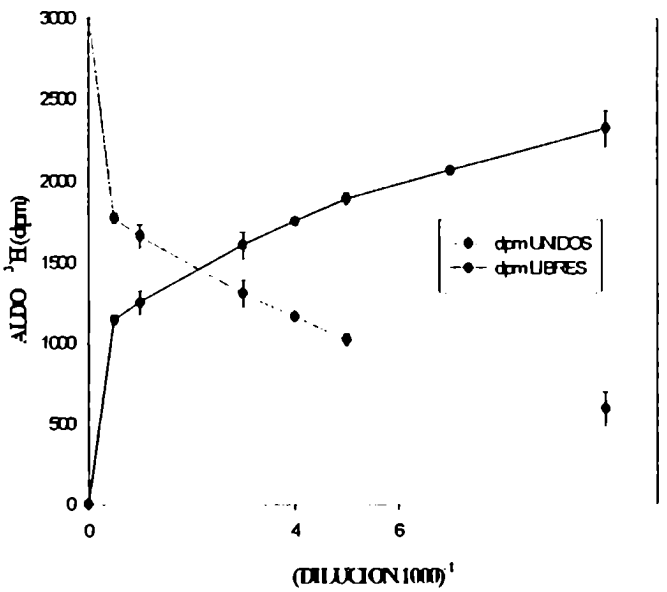


Figura 2.4: Curva para el cálculo del título de anticuerpo antialdosterona.

CONDICIONES DE INCUBACION: Descripción y Resultados

2.12 Condiciones óptimas de trabajo

Hasta aquí hemos visto algunas de las condiciones standard de trabajo pero recordemos que lo que necesitamos son todas las condiciones más apropiadas de trabajo. ¿Habrá un sistema buffer en donde la enzima trabaje mejor? ¿Se podrá mejorar la

actividad de la enzima si por ejemplo aumentamos la concentración de Ca^{++}? Tratemos de ver entonces qué ocurre si varianos por ejemplo algunas de las condiciones bajo las cuales ocurre la incubación.

2.13 Elección del buffer apropiado

Se probaron distintos buffers para las incubaciones usando como sustrato tanto 11-desoxicorticosterona como corticosterona. Las incubaciones se llevaron a cabo como fue descripto anteriormente y las determinaciones de cantidad de aldosterona biosintetizada se realizaron por radioinmunoensayo.

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 2.2

BUFFER	ng de ALDO A PARTIR DE DOC	ng de ALDO A PARTIR DE B
BICARBONATO	1.84 ± 0.46	1.79 ± 0.09
HEPES	0.89 ± 0.17	0.36 ± 0.10
TRIS	1.64 ± 0.21	0.55 ± 0.12
FOSFATO	1.55 ± 0.26	0.65 ± 0.06

Tabla 2.2: Cantidad de aldosterona obtenida a partir de 11-desoxicorticosterona y a partir de corticosterona en incubaciones usando los buffer indicados, y utilizando NADPH como cofactor. Los valores informados son referidos a 100µl de incubado La temperatura de incubación fue de 37°C y el tiempo de 30 minutos.

En cuanto a la composición de los buffers, en el caso del buffer bicarbonato, está descripta en la Tabla 2.1. El buffer Krebs-fosfato es de igual composición que el anterior, sin el agregado de $NaCO_3H$, teniendo en consideración que el pH de trabajo sea 7,4. El buffer Tris es 20mM y el buffer Hepes es de igual molaridad. Todas las soluciones fueron isotónicas.

Como se puede apreciar la mayor actividad se consiguió usando el buffer bicarbonato (Krebs Ringer bicarbonato- glucosa). Por lo tanto éste será el buffer utilizado para las futuras incubaciones.

2.14 Tiempo de incubación

Se estudió el comportamiento enzimático en incubaciones llevadas a cabo a distintos tiempos. Para ello se partió de 1μM de 11-deoxicorticosterona usando mitocondrias de cápsula adrenal como fuente enzimática y NADPH como cofactor; la temperatura de trabajo fue de 37°C. Se vio que la enzima cumplía con un comportamiento lineal los primeros 45 minutos de incubación (Figura 2.5).

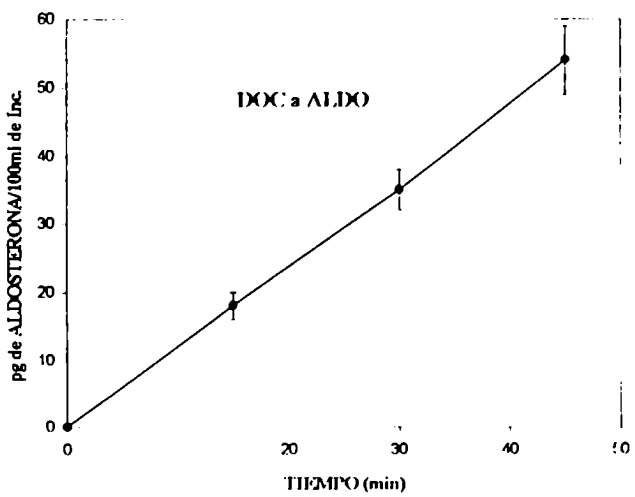


Figura 2.5: conversión DOC a ALDO. (Valor ± desvío standard de dos experimentos llevados a cabo por duplicado)

2.15 Requerimientos de iones Ca^{++} y/o Mg^{++}

En estudios esteroidogénicos con mitocondrias adrenales de diferentes especies se ha centrado la atención en el aparente rol que los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} juegan en la

actividad enzimática de formación de aldosterona (141). Por esta razón se creyó oportuno considerar los efectos de la presencia o no de ambos iones divalentes.

En este punto se investigó cuál es la incidencia en la reacción bioquímica de la presencia de estos iones en la solución utilizada como buffer de incubación. Para ello el protocolo de trabajo fue el siguiente:

SUSTRATO	$CaCl_2$	$MgCl_2$
DOC	-	-
DOC	+	-
DOC	-	+
DOC	+	+
B	-	-
B	+	-
B	-	+
B	+	+

Tabla 2.3: Protocolo seguido para investigar la influencia de los iones calcio (2.8μM) y magnesio (1,2μM) en solución, la concentración de los iones utilizada fue la correspondiente a la presente en el buffer Krebs-Ringer bicarbonato-glucosa. Concentración de DOC y de B 1μM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C.

Para este estudio las concentraciones de calcio y magnesio fueron las mismas que las utilizadas en el buffer Krebs Ringer bicarbonato-glucosa (Tabla 2.1), al cual se le agregó o se obvió el agregado del ión correspondiente, manteniendo la fuerza iónica constante.

Una vez realizado este experimento se procedió a estudiar cuál era la concentración óptima de estos iones en solución (Sección 2.17 y 2.18). Para ello se

utilizaron diferentes concentraciones de uno de los iones y presencia de una concentración constante del otro ión.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.6.

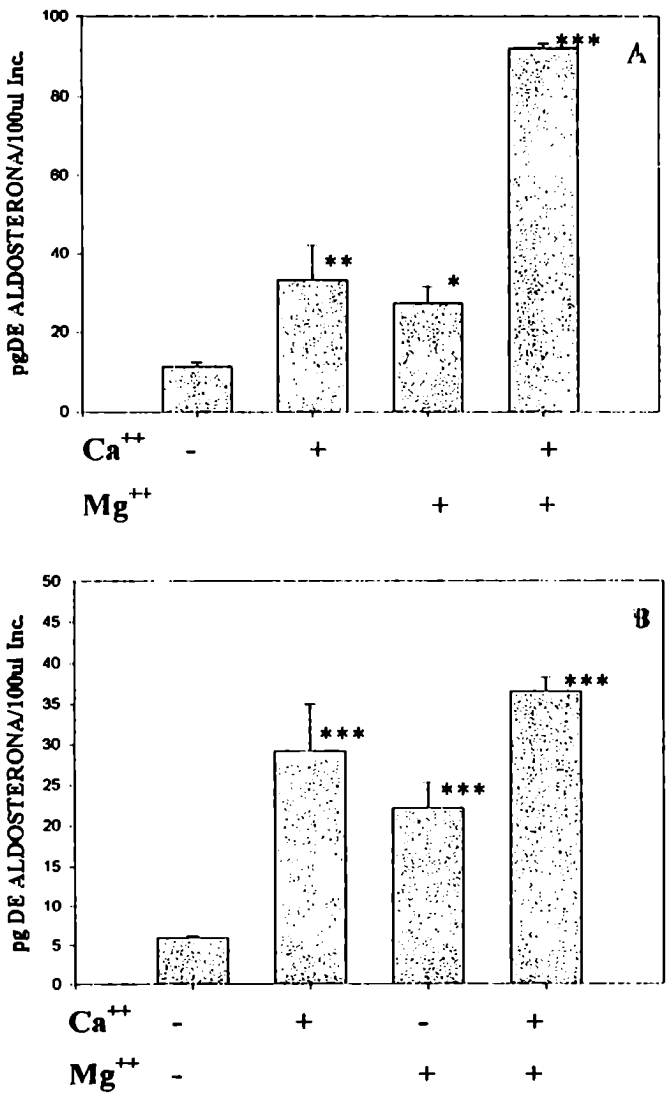


Figura 2.6: Conversión de: Panel **A)** DOC a ALDO, Panel **B)** B a ALDO en presencia o ausencia de los iones divalentes Ca^{++} y Mg^{++}. * $p< 0.05$; **$p< 0.01$ y *** $p< 0.001$ todos respecto del control

Como se puede apreciar la presencia de los iones Ca^{++} o Mg^{++} estimula la producción de aldosterona, a partir de 11-desoxicorticosterona y a partir de corticosterona. La presencia simultánea de ambos, por otro lado, causa un efecto sinergístico a partir de 11-desoxicorticosterona.

A partir de ambos gráficos se concluye que es necesario agregar ambos iones en los medios de incubación

2.16 Reemplazo del ión Ca^{++} por otros iones.

Se estudió hasta aquí qué ocurría con los iones Ca^{++} y Mg^{++} observándose que la presencia del ión Ca^{++} era necesaria. Nos podríamos ahora preguntar si podríamos cambiar este ión por otro que tenga igual carga, por ejemplo Sr^{++} o Zn^{++} pero distinto radio iónico manteniendo la concentración igual en todos los casos (2.8 µM). Las concentraciones de ión calcio y de ión magnesio corresponden a las concentraciones usadas en el buffer Krebbs-Ringer bicarbonato, glucosa. Veamos entonces cuál será el protocolo a seguir. (Tabla 2.4).

SUSTRATO	Ca^{++}	Sr^{++}	Zn^{++}	Mg^{++}
DOC	+	-	-	-
DOC	-	+	-	-
DOC	-	-	+	-
DOC	-	-	-	+

Tabla 2.4: protocolo para el estudio del cambio de iones Ca^{++} por otros de diferente radio iónico e igual carga. La concentración de los iones utilizada fue 2.8 µM Concentración de DOC 1µM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C.

Los datos obtenidos en estos experimentos se hallan en la figura 2.7.

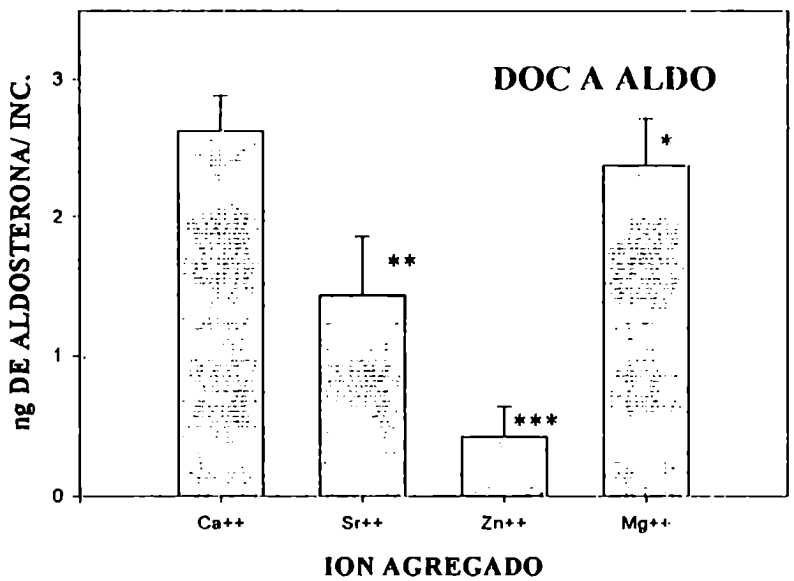


Figura 2.7: Incidencia del ión divalente agregado al buffer de incubación, concentración de los iones divalentes 2.8 μM . * no significativo; **p< 0.01 y *** p< 0.001 todos respecto del control con el ión calcio.

De esta forma, los resultados sugieren que el ión Ca^{++} es el óptimo entre los iones divalentes probados.

2.17 ¿Cuál es la concentración óptima de Calcio?

Sabemos hasta aquí que el ión calcio es importante en la transformación de 11-desoxicorticosterona a aldosterona; se estudió luego entonces cuál es la concentración apropiada para el trabajo de laboratorio. Para ello se realizaron experimentos a

concentración constante de ión magnesio (1.2μM) y concentraciones variables de ión calcio desde 0 a 3.7μM. Los datos obtenidos se encuentran graficados en la Figura 2.8.

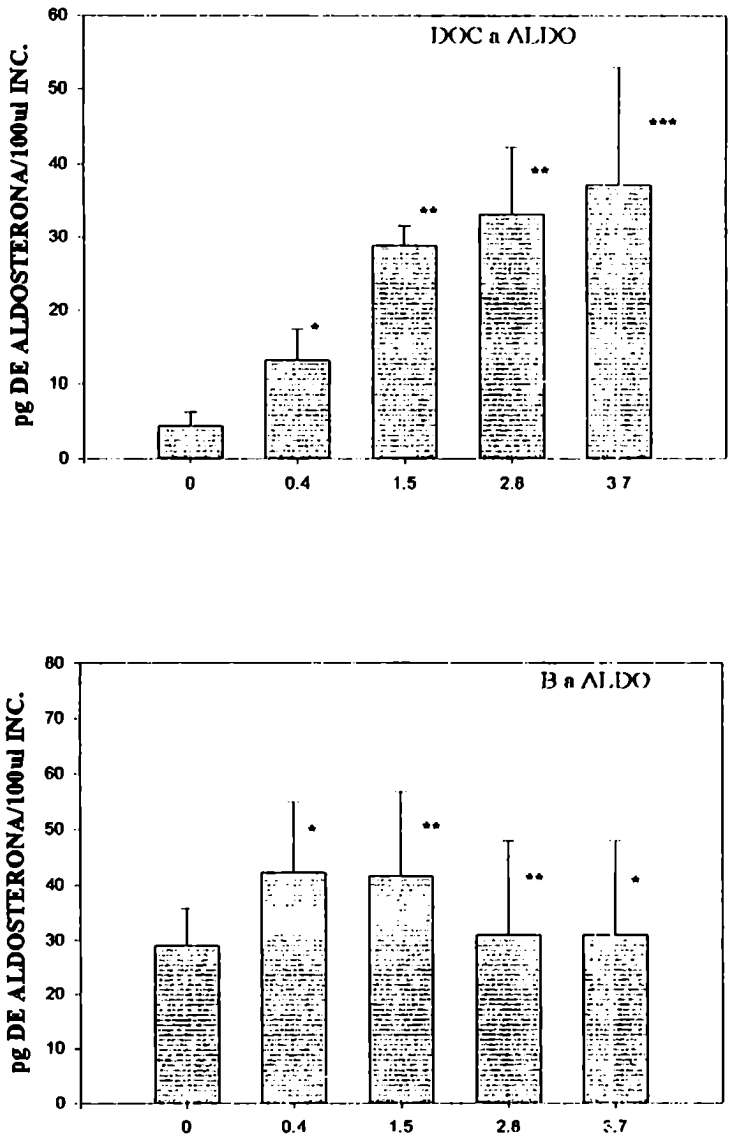


Figura 2.8: Conversión de DOC a ALDO a concentraciones de Ca^{++} variables, desde 0 a 3.7μM. Concentración de DOC y de B 1μM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C. * no significativo; **p< 0.01 y *** p< 0.001 todos respecto del control.

Como se puede ver la producción de aldosterona a partir de 11-desoxicorticosterona aumenta en forma dependiente de la concentración de Ca^{++} mientras que a partir de corticosterona la producción de aldosterona aparenta aumentar hasta 1,5 μM de Ca^{++} y luego desciende a concentraciones mayores, aunque todas las diferencias no son significativas.

Hasta aquí entonces, se ha determinado la influencia del ión Ca^{++} en la producción de aldosterona.

Por otro lado, comparando los paneles A y B de la Figura 2.6 y los paneles de la Figura 2.8, se observa que las variaciones de la producción de aldosterona producida por la presencia de los iones divalentes son significativamente diferentes a partir de 11-desoxicorticosterona en forma comparativa que a partir de corticosterona. Estas diferencias pueden deberse a:

i) a partir de 11-desoxicorticosterona se habilitan caminos alternativos que no son transitados cuando se incuba con corticosterona como sustrato (Figura 2.8).

ii) una enzima diferente a la que cataliza la transformación de corticosterona a aldosterona, convierte 11-desoxicorticosterona a corticosterona.

La primera hipótesis requeriría estudios usando como sustratos esteroides pertenecientes a los caminos alternativos, lo cual no será abordado aquí.

La segunda hipótesis puede ser puesta a prueba midiendo, bajo las mismas condiciones experimentales, la transformación de 11-desoxicorticosterona a corticosterona.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.9. Se observa entonces que el comportamiento de DOC a B es diferente que el de B a ALDO y semejante al de 11-desoxicorticosterona a aldosterona (comparar Figura 2.9 con Figura 2.8). Esto corroboraría la existencia de dos enzimas.

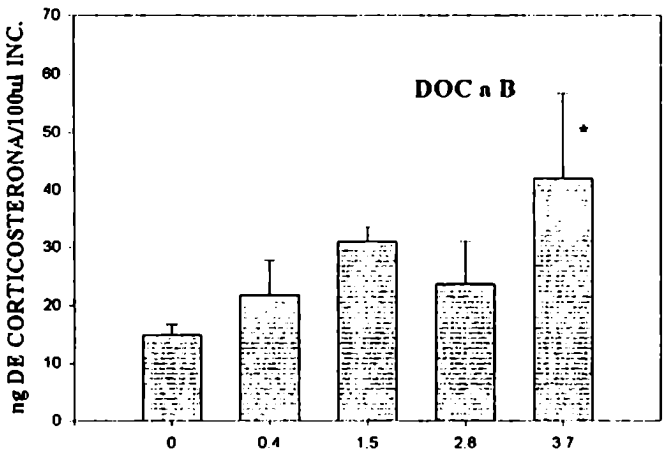


Figura 2.9: Conversión de DOC a B a diferentes concentraciones de Ca^{++}, desde 0 a 3.7μM Concentración de DOC 1μM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C. *p< 0.01 respecto del control, la otras diferencias no son significativas.

2.18 ¿Cuál es la concentración óptima de Magnesio ?

Veamos ahora cuál es la concentración más apropiada de trabajo con respecto a la concentración del ión magnesio en solución.

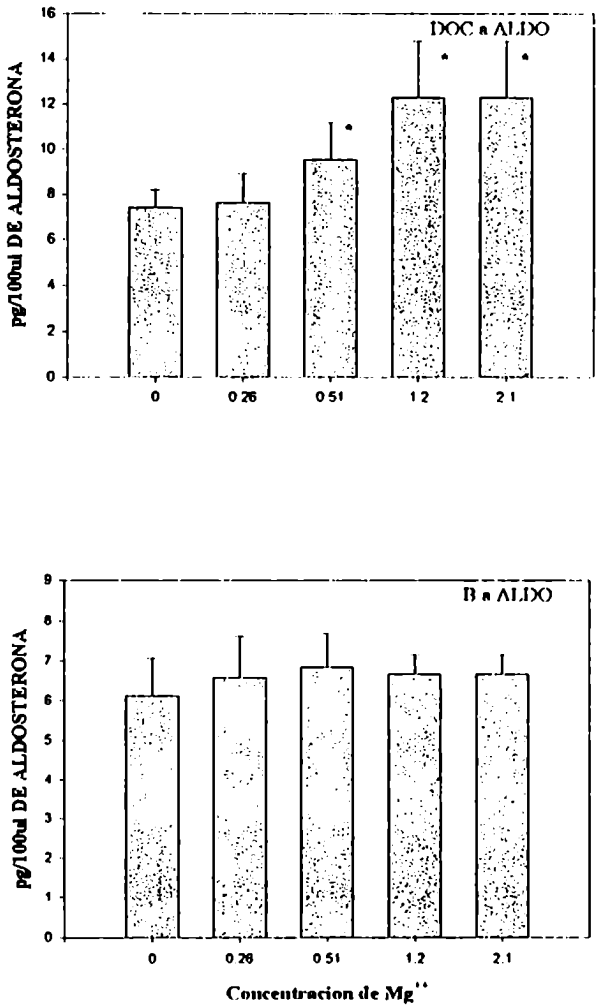


Figura 2.10: Conversión de DOC a ALDO a diferentes concentraciones de Mg^{++}, desde 0 a 2.1μM. Concentración de DOC y de B 1μM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C. *p< 0.01 respecto del control, la otras diferencias no son significativas.

Para el caso de DOC a ALDO se observan diferencias las que son poco significativas p< 0.01. En el caso de B a ALDO no se observan diferencias. Por lo tanto el ión Mg^{++} influye levemente en los últimos pasos de la conversión de 11-

desoxicorticosterona en aldosterona, no existiendo grandes variaciones con la concentración del ión.

2.19 Métodos separativos: Sistemas cromatográficos

Durante el curso de estos trabajos de laboratorio se hizo necesario encontrar métodos separativos adecuados para poder así evaluar a los esteroides tanto cuali como cuantitativamente. En este sentido, se necesitan sistemas de desarrollo rápido, capaces de separar los diferentes compuestos 18-hidroxilados los cuales, en algunos casos, poseen una alta inestabilidad. Como se verá a continuación se han utilizado cromatografías en papel, cromatografías en placa delgada y HPLC.

2.19.1 Cromatografía en papel

En los casos en los cuales se necesitó utilizar cromatografía en papel como método separativo el sistema utilizado fue Bush B5. Este sistema utiliza la mezcla: Benceno : metanol : agua (1 : 0.5 : 0.5) como solvente de corrida. Es de hacer notar que esta mezcla consta de dos fases en equilibrio, una rica en solvente orgánico, y usada como fase móvil y la otra rica en solvente acuoso, usada como fase fija (142).

Se trata de una cromatografía descendente, que utiliza papel Whatman N°1 en forma de cortina con tiras de 2 cm de ancho por 45 cm de largo separadas por una luz de 0.5 cm de ancho. El ancho de las tiras se adaptó de forma tal de poderlas pasar por el radiocromatógrafo. En este sistema se usó rojo de metilo como colorante marcador del frente de la corrida. Se sembró entonces en una calle el colorante y en las demás calles los esteroides a estudiar. Las determinaciones cualitativas se sembraron en punto mientras que para las determinaciones cuantitativas la siembra se realizó en banda.

Una vez realizadas las siembras se colocan las tiras de papel en las cubas cromatográficas dejando llegar al equilibrio por espacio de una hora; luego se desarrolla

el cromatograma colocando en la navecilla la mezcla de solvente de corrida (fase móvil). Se trabaja en un cuarto termostatizado a 28°C. La duración de la corrida es de aproximadamente cuatro horas y media.

La detección de los compuestos fue realizada por observación a luz de 254 nm si se trata de muestras radioinertes. Es de hacer notar que los esteroides que absorben a 240nm (Δ_{4-3} ceto) se pueden detectar con una lámpara UV de onda corta utilizando una emisión principal de 254nm. El papel fluoresce levemente con una emisión azulada y la mancha del esteroide aparece más oscura identificándose así su posición por contraste con el fondo.

Pero, cuando las sustancias a detectar eran radioactivas se utilizó un radiocromatógrafo con detector β tipo Geiger-Müller. En ambos casos se eluyeron los compuestos de la siguiente manera: la zona del papel conteniendo al esteroide fue cortada en cuadraditos de aproximadamente 0,5 cm de lado y puestas en erlenmeyer de 25 ml.

El solvente de elución fue metanol en general, sin embargo para el caso del dímero de 18-hidroxicorticosterona (ver más adelante) se estudió si en esta extracción no influía el solvente de elución, entonces también se probó extraer con cloruro de metileno.

Los erlenmeyer fueron tapados con parafilm y puestos en un agitador. Al cabo de 15 minutos se volcaron los eluídos en un tubo para la posterior evaporación del solvente. Este proceso se realizó tres veces habiéndose comprobado con anterioridad que el grado de recuperación del material con este protocolo es del 99%.

2.19.2 Cromatografía en capa delgada

En los casos en los cuales se necesitó utilizar cromatografía en capa delgada se recurrió a cromatofolios de aluminio de silicagel 60 con indicador de fluorescencia para cromatografía en capa delgada (Merck). En este sistema la mezcla utilizada como fase móvil fue: Cl_2CH_2 : CH_3OH : CH_3CN (86:7:7) y se eligió esta composición de solventes basándose en trabajos anteriores como por ejemplo el de Quesenberry, R.O. et al.(143) y trabajos realizados en nuestro laboratorio (144).

Se trata de una cromatografía ascendente, donde el frente de corrida es observado directamente. Se sembraron entonces los esteroides a estudiar disueltos en $Cl_2C_2H_2$ o en CH_3OH. Las determinaciones cualitativas se sembraron en punto mientras que para las determinaciones cuantitativas la siembra se realizó en banda.

Una vez realizadas las siembras se colocaron las placas en cubas de cromatografía conteniendo el solvente en cuestión, teniendo la precaución que la cuba esté saturada. Se desarrolló la corrida la cual tuvo un tiempo de corrida de aproximadamente una hora y cuarto. La detección de los compuestos fue realizada por observación a luz de 254 nm si se trata de muestras radioinertes. La placa fluoresce gracias al indicador de fluorescencia y así la mancha del esteroide aparece más oscura identificándose su posición por contraste con el fondo.

Pero, si las sustancias a detectar eran radioactivas entonces se utilizó un radiocromatógrafo con detector β tipo Geiger-Müller. En ambos casos se extrajeron los compuestos de la siguiente manera: la zona de la placa conteniendo al esteroide fue raspada y la sílica conteniendo al esteroide colocada en pequeñas columnitas con lana de vidrio que tendrá la función de retener la sílica raspada y dejar pasar al esteroide en cuestión solubilizado.

El solvente de elución fue Cl_2CH_2 : CH_3OH (95:5). Se recogió el material en estudio en 4 ml de esta mezcla la cual fue llevada a sequedad (en atmósfera de N2) para su posterior dilución en un volumen conocido de un determinado solvente. Uno se podría preguntar aquí ¿por qué no se utilizó metanol sólo para eluir las muestras, siendo el metanol uno de los mejores solventes para la solubilización de los esteroides? Es de hacer notar que la sílica es parcialmente soluble en metanol, entonces si bien solubilizaría al esteroide también estaría disolviendo a la sílica que lo contiene. No ocurre lo mismo con el cloruro de metileno, pero para mejorar la interacción de la solución con la sílica raspada de la placa se coloca un pequeño porcentaje de CH_3OH resultando de esta manera una mezcla un poco más polar.

2.19.3 Cromatografía en HPLC

Hasta aquí hemos visto la separación de esteroides mediante dos tipos diferentes de cromotografías, pero ¿qué es lo nuevo que aporta la cromatografía de alta presión? El sistema de detección de los dos métodos anteriores es pobre frente al dato aportado por el detector UV de los equipos de HPLC. Este sistema de resolución resulta también mucho más rápido que los dos anteriores. Pero, entonces ¿por qué no usar directamente este sistema? La cromatografía en papel por ejemplo admite mayor cantidad de muestra. En la cromatografía por HPLC se hace dificultosa la separación de 18-hidroxicorticosterona y aldosterona mientras que en capa delgada la separación es mejor.

INHIBICION POR CORTISOL

Capítulo 3 Inhibición de la formación de la aldosterona por el cortisol en la mitocondria de adrenal de rata.

3.1 Enzimas sensibles a cortisol y no sensibles a cortisol. Introducción

El principal camino biosintético desde 11-deoxicorticosterona a aldosterona en la adrenal de rata involucra la siguiente secuencia: 11-desoxicosticosterona ⇢ corticosterona ⟶ 18-hidroxicorticosterona ⟶ aldosterona (83;145)(Figura 1.7).

Estas conversiones, que consisten en hidroxilaciones en las posiciones 11β ó 18, son dependientes tanto de NADPH como de O_2 y están catalizadas por enzimas de la familia de los citocromos P450.

El humano, el ratón y la rata poseen dos citocromos P450 (102;146-148) con actividades de 18-hidroxilasa (CYP11B1 y CYP11B2, ver Introducción), siendo esta actividad dependiente del sustrato para cada una de las enzimas. Así es como ambas enzimas catalizan el paso de 11-deoxicorticosterona a corticosterona.

La enzima CYP11B1 catalizaría el paso de 11-desoxicorticosterona a 18-hidroxicorticosterona (52;101;149;150), mientras que sólo el citocromo CYP11B2 catalizaría el paso de corticosterona a 18-hydroxicorticosterona y a aldosterona (150). Todos estos caminos biosintéticos fueron dilucidados usando las enzimas purificadas. No ha habido una validación usando mitocondrias como fuente enzimática. Sin embargo esta validación es importante ya que las actividades de los citocromos de la esteroidogénesis adrenal son dependientes en extremo, por ejemplo, de su entorno lipídico (151-153), la presencia de antioxidantes endógenos (134;154) y dilución (20) dentro de una gran cantidad de factores que los afectaría.

Hoy en día se ha aceptado que el citocromo CYP11B2 está confinado en la zona glomerulosa y que el CYP11B1 existe en la zona fasciculata aunque la existencia del citocromo CYP11B1 en la zona glomerulosa está aún en discusión. Muchos grupos de investigación sustentan esta posibilidad (95;155;156) así como también existen otros grupos que no concuerdan con esta teoría (97;157;158).

La 18-hidroxicorticosterona se produce en las tres zonas corticoadrenales pero, la

aldosterona, sólo se forma en la zona glomerulosa de la misma, no existiendo una explicación para la biosíntesis exclusiva de aldosterona en esta única zona.

El cortisol no se produce en la glándula adrenal de la rata. Se sabe que en las incubaciones en las cuales se usan glándulas adrenales de vaca dicho esteroide se convierte a 18-hidroxicortisol y 18-oxocortisol (118;119;159) usando el mismo sistema enzimático que utilizaría la transformación de corticosterona a 18-hidroxicorticosterona y a aldosterona. Emeric-Blanchoulin et al. (160) han confirmado que el cortisol inhibe la conversión tanto de corticosterona como de 18-hidroxicorticosterona a aldosterona en la glándula adrenal de pato.

Como se verá en la discusión, este inhibidor extraño al sistema, será utilizado para la caracterización y la categorización de las enzimas presentes en un dado tejido.

En el trabajo de laboratorio se ha utilizado al cortisol para inhibir la formación de aldosterona a partir de diferentes sustratos, y para categorizar a las reacciones involucradas en el metabolismo de 11-deoxicorticosterona por la corteza adrenal de rata en reacciones enzimáticas sensibles a cortisol y no sensibles a cortisol.

3.2 Materiales y métodos

[1,2-^{3}H]-11-deoxicorticosterona, [1,2-^{3}H]-corticosterona y [1,2-^{3}H]-18-hidroxicorticosterona fueron adquiridas en Amersham Corporation (Arlington Heights, IL). 11,18-Epoxicorticosterona (18-desoxialdosterona (82;161;162)), tanto radioactivos como radioinerte fueron obtenidos a partir de 18-hidroxicorticosterona por el método de cloruro de metileno saturado con ácido p-toluensulfónico (119). Los otros esteroides radioinertes como así también los reactivos usados para la preparación de los buffers fueron comprados a Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

3.2.1 Preparación e incubación de las mitocondrias

Ratas CHBB-Thom (150-200 grs.) fueron sacrificadas por decapitación y sus adrenales se removieron rápidamente, se las colocó inmediatamente en solución salina (NaCl 0.9%), se las

limpió de los ácidos grasos que las rodeaban así como de los tejidos circundantes y finalmente fueron decapsuladas. Las cápsulas adrenales se homogeneizaron en un buffer Krebs-Ringer-bicarbonato-glucosa de pH=7.2, y las mitocondrias fueron separadas por centrifugación como se ha informado anteriormente (76). El pellet final de mitocondrias fue recontituído en el mismo buffer y se tomaron alícuotas (0.6 mg de proteínas mitocondriales). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.5ml en presencia del esteroide radioactivo como sustrato, con o sin otro esteroide radioinerte (ver resultados). Las incubaciones fueron iniciadas por el agregado de 0.5mM de NADPH y fueron interrumpidas colocando los tubos en un baño de hielo-agua durante 15 minutos. Los sobrenadantes de las incubaciones se obtuvieron por centrifugación de las muestras a 10.000 rpm durante 10 minutos y se extrajo dos veces con 5 volúmenes de cloruro de metileno. La recuperación en esta extracción fue constante en todas las muestras y su valor fue de 96 %.

3.2.2 Separación y cuantificación

Se agregó al sistema conteniendo el esteroide biosintetizado una pequeña cantidad del esteroide a estudiar para así estimar la eficiencia de la recuperación (163). Por otro lado se usaron esteroides no radioactivos los cuales fueron agregados a la solución conteniendo al esteroide radioactivo (el del extracto orgánico) para determinar la recuperación luego de la separación por placa de TLC y posterior cuantificación por cromatografía de HPLC. Este último procedimiento fue empleado anteriormente en el laboratorio (118) y es altamente recomendable como una elección alternativa en estudios biosintéticos.

Luego de agregar una cantidad conocida del esteroide a ser medido (6μg) los extractos orgánicos fueron sembrados en placas de sílica gel con indicador de UV usando como solvente de corrida la mezcla cloruro de metileno metanol acetonitrilo (86 : 7 7). La posición de los distintos productos se reveló al UV y el área correspondiente a cada esteroide fue cuidadosamente sacada de la placa y usada para empaquetar pequeñas columnitas conteniendo lana de vidrio como soporte inferior de las mismas. Para este propósito, la sílica extraída de la placa (aproximadamente 80-120mg dependiendo de la mancha del esteroide) fue empaquetada en unas columnas plásticas cónicas de 1cm x 5cm (donde la altura de la sílica será de aproximadamente 1cm). Los esteroides fueron posteriormente eluídos de estas columnas con una mezcla de cloruro de metileno: metanol

en proporción 95:5. Los eluatos fueron evaporados bajo N_2 a 37°C, reconstituidos en un volumen dado de metanol y resueltos usando cromatografía por HPLC (bomba P-100, detector UV-100 e Integrador SP-4600 de Spectra Physics Analytical (Fremont, CA, USA)). Las condiciones para la cromatografía en HPLC fueron las siguientes: la columna usada fue una μBondapack C-18, la detección se realizó a una absorbancia de 254nm, la fase móvil utilizada fue una mezcla metanol : agua (3:2), y el flujo fue de 0.8 ml/min.

Los eluídos de la columna de HPLC fueron colectados en fracciones de 0.26 ml a lo largo de toda la corrida y la radioactividad (en cada una de ellas) se midió en un contador de centelleo líquido. La radioactividad del esteroide correspondiente a cada pico resuelto en esta cromatografía se calculó sumando las radioactividades de las fracciones colectadas asociadas con el pico. A esto se lo llamará de ahora en más pico-radioactivo.

La masa del esteroide correspondiente al pico resuelto por HPLC, al cual se denominó pico-masa, se calculó por comparación con una curva de calibración obtenida con el esteroide standard correspondiente.

La recuperación fue calculada de la siguiente forma:

$$\%Rec. = pico\text{-}masa \times Vt \times 100 / (Va \times 6ug)$$

siendo Vt el volumen total en el que se encuentra la muestra en cuestión y Va el volumen de la alícuota inyectado en el HPLC (25μl). Como la masa del esteroide endógeno es despreciable frente a la masa del esteroide exógeno agregada al extracto orgánico (6ug), el pico-masa puede ser tomado como el correspondiente al trazador exógeno.

Las recuperaciones fueron luego usadas para calcular el "pico-radioactivo", para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$Radioactividad\ del\ esteroide\ X = pico\ de\ radioactividad \times 100 / \%Rec.$$

donde el esteroide X es el esteroide a determinar.

Los tiempos de retención usuales fueron: 4.9 min. para corticosterona, 6.9 min. para aldosterona y 7.8 min. para 18-hidroxicorticosterona.

La pureza del esteroide radioactivo colectado luego de la corrida por HPLC se confirmó

por recristalización hasta actividad específica constante. Para este propósito, al extracto orgánico del medio de incubación se le agregó 6.3mg de aldosterona no radioactiva la cual fue recristalizada usando como solvente la mezcla acetona : agua. Este procedimiento fue repetido hasta llegar a actividad específica constante (**AE1**).

Por otro lado, al pico de "aldosterona" radioactivo eluído de la corrida por HPLC se le agregó una cantidad de aldosterona igual a (6.3mg x %Rec./100). La actividad específica de esta fracción luego de la recristalización (**AE2**) se comparó con la actividad especifica anteriormente hallada (**AE1**). El criterio seguido para confirmar la pureza del esteroide colectado luego de la cromatografía por HPLC fue el siguiente:

1) Si **AE2** es menor que **AE1**, indicaría que la sustancia no está pura.

2) Si **AE2** es igual a **AE1**, indicaría pureza de la sustancia y

3) Si **AE1** es menor que **AE2** puede indicar un error ya que este resultado no tiene sentido.

En unos pocos experimentos se usó cortisol tritiado como sustrato y los radiometabolitos fueron analizados como se describió anteriormente.

3.2.3 Misceláneas

Las proteínas fueron medidas por el método de Bradford, M.M. (140).

La unión específica de cortisol y 18-hidroxicortisol a la mitocondria adrenal se determinó como ya fue informada anteriormente en otros trabajos (147).

3.3 Resultados

3.3.1 Cuantificación de radiometabolitos

En estudios preliminares se ha determinado la pureza de los esteroides aislados del medio de incubación luego de separación por cromatografías sucesiva, TLC-HPLC (ver Parte Experimental), mediante recristalizaciones en acetona/agua (164;165) hasta actividad específica constante. Para ello se agregó 6.3mg de aldosterona fría al extracto orgánico del medio de incubación para proceder luego con las sucesivas recristalizaciones.

La actividad específica baja a través de los sucesivos pasos de recristalización desde 333.0 dpm/μg hasta alcanzar un valor constante de 91.6 dpm/μg (**AE1**).

Por otro lado, al radioactivo de comportamiento similar a aldosterona eluído del HPLC (ver parte experimental) se le agregó una cantidad de aldosterona no radioactiva equivalente al producto 6.3mg x % Rec./100 luego de colectarla en el HPLC (Ver parte experimental).

La actividad específica de esta fracción fue de 92.0 dpm/μg (**AE2**). Las subsecuentes recristalizaciones de esta fracción no produjeron una bajada en este valor (91.6 dpm/μg).

Los valores similares de **AE1** y **AE2** permiten concluir que el material que se comporta como aldosterona luego de las separaciones por TLC y HPLC es exclusivamente aldosterona (Ver parte experimental). Resultados similares fueron obtenidos para otros productos.

FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA (dpm/μg)
INICIAL	333.0
1	88.6
2	118.0
3	91.9
FINAL	91.6

Tabla 3.1: Actividad específica (AE) de la fracción que se comporta como si fuera aldosterona. La fracción inicial corresponde al extracto orgánico del sobrenadante luego de la incubación de las mitocondrias adrenales con 1μM de 11-deoxi-corticosterona durante 45 minutos en presencia de NADPH 0.5mM (Ver parte experimental para más detalle).

3.4 Capacidad biosintética para aldosterona

Como se vio en el párrafo 2.14 la formación de aldosterona a partir de 1μM de 11-deoxicorticosterona fue lineal hasta los 45 minutos.

La biosíntesis de 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona, corticosterona y aldosterona a partir de 11-deoxicorticosterona, así como también 18-hidroxicorticosterona y aldosterona a partir de corticosterona se midieron a concentraciones de sustrato variables. La aparente K_M y Vmáx se han obtenido mediante gráficos de Lineweaver-Burk y se muestran en la Tabla 3.2

SUSTRATO	PRODUCTO	K_M (μM)	V_{MAX} (nmol-min x mg proteínas)
DOC	B	17.9±2.1	16.5±2.9
DOC	18 OHDOC	36.3±4.9	53.2±4.2
DOC	ALDO	22.5±3.7	1.27±0.08
B	18OHB	3.2±0.6	1.37±0.09
B	ALDO	1.3±0.2	0.69±0.09
18DAL	ALDO	4.7±0.9	0.11±0.02

Tabla 3.2: K_M y V_{MAX} aparentes. Abreviaciones usadas: DOC: 11-deoxicorticosterona, B: corticosterona, 18 OHDOC: 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona, ALDO: aldosterona, 18 DAL: 11,18-epoxycorticosterona, 18 OHB: 18-hidroxicorticosterona.
Los valores de K_M y V_{MAX} fueron calculados a partir de gráficos de Lineaweaver-Burk, los cuales fueron construidos a partir de seis concentraciones diferentes de sustrato, por duplicado.

3.5 Efecto de cortisol

La adición de 10μM de cortisol a las incubaciones con 1μM de 11-deoxicorticosterona baja la producción de aldosterona mientras que las producciones de 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona y corticosterona no fueron afectadas o aumentó muy débilmente (Tabla 3.3). Estos resultados sugieren que el cortisol está disminuyendo la producción de aldosterona a partir de 11-deoxicorticosterona inhibiendo un paso posterior a la formación de corticosterona.

Además, la presencia de 10 μM de cortisol también decrece las producciones de 18-hidroxicorticosterona y aldosterona a partir de corticosterona (Tabla 3.3), quedando así confirmado que el cortisol inhibe el metabolismo de corticosterona.

En miras de investigar qué tipo de inhibición ejerce el cortisol sobre la producción de aldosterona a partir de corticosterona, se obtuvieron los gráficos de Lineweaver Burk. La figura 1 muestra una típica inhibición competitiva para la formación de aldosterona a partir de corticosterona usando como inhibidor cortisol, siendo su Ki de 2.5±0.5 μM (valor ± desvío standard).

3.6 Unión del cortisol y su metabolismo

Se ha mostrado previamente que el cortisol y la corticosterona muestran un sitio de unión al citocromo mitocondrial en la zona glomerulosa de la glándula adrenal bovina, así el cortisol resulta ser un inhibidor de la transformación de corticosterona en aldosterona (76).

Para poner a prueba esta hipótesis en la mitocondria de la glándula adrenal de rata, se han realizado estudios de "binding" con las preparaciones antes descriptas.

El cortisol tritiado se une específicamente a la mitocondria de la zona glomerulosa de la glándula adrenal. Esta unión fue desplazada por cortisol radioinerte en forma dependiente de la dosis (Tabla 3.4).

SUSTRATO (1µM)	PRODUCTO	CORTISOL (10µM)	PROPORCION
DOC	B	-	1.00 ± 0.05
		+	1.22 ± 0.11[a]
DOC	18OHDOC	-	1.00 ± 0.09
		+	1.18 ± 0.11
DOC	ALDO	-	1.00 ± 0.03
		+	0.04 ± 0.06[b]
B	18OHB	-	1.00 ± 0.15
		+	0.21 ± 0.03[a]
B	ALDO	-	1.00 ± 0.06
		+	0.43 ± 0.07[a]
18OHDOC	ALDO	-	1.00 ± 0.15
		+	0.45 ± 0.06[c]
18OHB	ALDO	-	1.00 ± 0.16
		+	0.69 ± 0.03
18DAL	ALDO	-	1.00 ± 0.05
		+	0.35 ± 0.05[b]

Tabla 3.3: Proporción de la transformación de sustrato en el producto indicado en presencia (+) o ausencia (-) de cortisol sobre la proporción de la transformación en ausencia de cortisol (-). Las abreviaturas se pueden encontrar en la Tabla 3. Los resultados están expresados como la media ± el desvío standard de dos a cuatro experimentos llevados a cabo por duplicado.

[a]$p< 0.02$; [b]$p<0.01$; [c]$p<0.05$. Todos los valores de p son con respecto al control sin cortisol. Análisis de la varianza (ANOVA).

CORTISOL (μM)	OTROS ESTEROIDES (10μM)	UNION ESPECIFICA (CPM)
0		5340±287
0.01		5224±365
0.1		4238±207
1		1540±87*
10		389±38*
100		62±9*
-	B	224±18*
-	18OHDOC	376±26*
-	DOC	4779±215

Tabla 3.4: Unión específica de cortisol a la adrenal de rata. Los datos están expresados como la media ± el desvío standard de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. (-) significa que no se agregó ningún esteroide. Las abreviaciones se encuentran especificadas en la Tabla 3. *$p < 0.01$ con respecto al control que no tiene agregado esteroide (ANOVA).

FCEyN BIBLIOTECA

El agregado de corticosterona y 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona, pero no de 11-deoxicorticosterona, también disminuye significativamente la unión del cortisol (Tabla 3.4).

Cuando se realiza una incubación con 1μM de cortisol tritiado con mitocondrias de adrenal de rata en presencia de 0.5mM de NADPH durante 40 minutos y se analizan los radiometabolitos por TLC (Ver parte experimental), el pico principal de radioactividad co-migra con el standard de ^{3}H-18-hidroxicortisol. El porcentaje de conversión fue del 4.0±1.2% (valor ± desvío standard, n=2).

SUSTRATO	PRODUCTO	18DAL (10μM)	PROPORCION
DOC	B	-	1 00 ± 0.09
		+	1 09 ± 0.08
DOC	18OHDOC	-	1 00 ± 0.12
		+	1 04 ± 0.06
DOC	ALDO	-	1.00 ± 0.08
		+	0.45 ± 0.05[a]
18OHB	ALDO	-	1.00 ± 0.06
		+	0 57 ± 0.07[b]

Tabla 3.5: Estudio del efecto de 11,18-epoxicorticosterona (18DAL). Proporción: transformación de la cantidad de sustrato en el producto indicado en presencia de 18DAL (+) sobre la transformación en ausencia de 18DAL (-). Los datos están expresados como la media ± el desvío standard de dos a cuatro experimentos llevados a cabo por duplicado. Las abreviaciones se encuentran especificadas en la Tabla 3. [a]$p< 0.05$ y [b]$p< 0.02$ con respecto al control con y sin 18DAL (ANOVA).

3.7 Transformación de 11,18-epoxicorticosterona en aldosterona

11,18-epoxicorticosterona es convertida a aldosterona por las preparaciones mitocondriales usadas.

El agregado de cortisol 10μM disminuye esta conversión de 11,18-epoxicorticosterona en aldosterona. Se observa en presencia de cortisol un efecto competitivo de este último esteroide (Figura 3.1).

La conversión de 11,18-epoxicorticosterona en aldosterona también bajó en aproximadamente un 41 ± 1% ($p = 0.02$, ANOVA) en presencia de 11-deoxicorticosterona en concentración 1μM.

Por otro lado, 11,18-epoxicorticosterona inhibió las conversiones de 11-deoxicorticosterona y 18-hidroxicorticosterona en aldosterona pero no la de 11-deoxicorticosterona en corticosterona y 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona (Tabla 3.5). Por lo

tanto 11,18-epoxicorticosterona tiene un comportamiento similar de inhibición como cortisol sobre los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona.

3.8 Discusión

Los sustratos alternativos, extraños al sistema en estudio, son sustancias que no son producidas por el tejido con el cual estamos trabajando pero que se unen y compiten por los mismos sitios de la enzima como si fuera un intermediario endógeno. En otras palabras, estos sustratos alternativos inhiben la conversión del intermediario radioactivo al producto final compitiendo por sitios comunes de la enzima, produciendo así una acumulación de radioactividad en el intermediario y bajando la concentración de estos en los productos finales.

El cortisol cumple con todas estas condiciones requeridas para un sustrato alternativo o inhibidor extraño al sistema y actúa como competidor como se ha descripto en el párrafo anterior. Por lo tanto: a) no es producido por la glándula adrenal la cual notoriamente carece de la actividad de 17-hidroxilasa, b) las publicaciones de las últimas dos décadas primero sugieren (119) y luego confirman (118) que el cortisol es transformado por la glándula de otras especies en 18-hidroxicortisol y 18-oxocortisol por la enzima que convierte corticosterona en aldosterona. Los primeros resultados fueron obtenidos por Chu, M.D. y Ülick, S. (166), quienes aislaron 18-oxocortisol de la orina de pacientes con aldosteronismo primario Además, 18-oxocortisol y 18-hidroxicortisol son secretados, en exceso, en los pacientes con adenomas y en aquellas personas con aldosteronismo suprimible por corticoides (167).

Más recientemente, se han obtenido evidencias cinéticas en donde el cortisol y la corticosterona compiten por un mismo citocromo P-450 en la mitocondria de adrenal de pato (160) y en la mitocondria de glomerulosa adrenal bovina (118).

Este último trabajo indica que el cortisol es metabolizado a 18-hidroxicortisol y 18-oxocortisol por un citocromo P-450 mitocondrial idéntico a aquel que cataliza la conversión de corticosterona a aldosterona. Además en la glomerulosa bovina corticosterona y cortisol se unen a la misma proteína mitocondrial (76), y esto se ha confirmado, en este trabajo, para la mitocondria de adrenal de rata (ver Tabla 3.4).

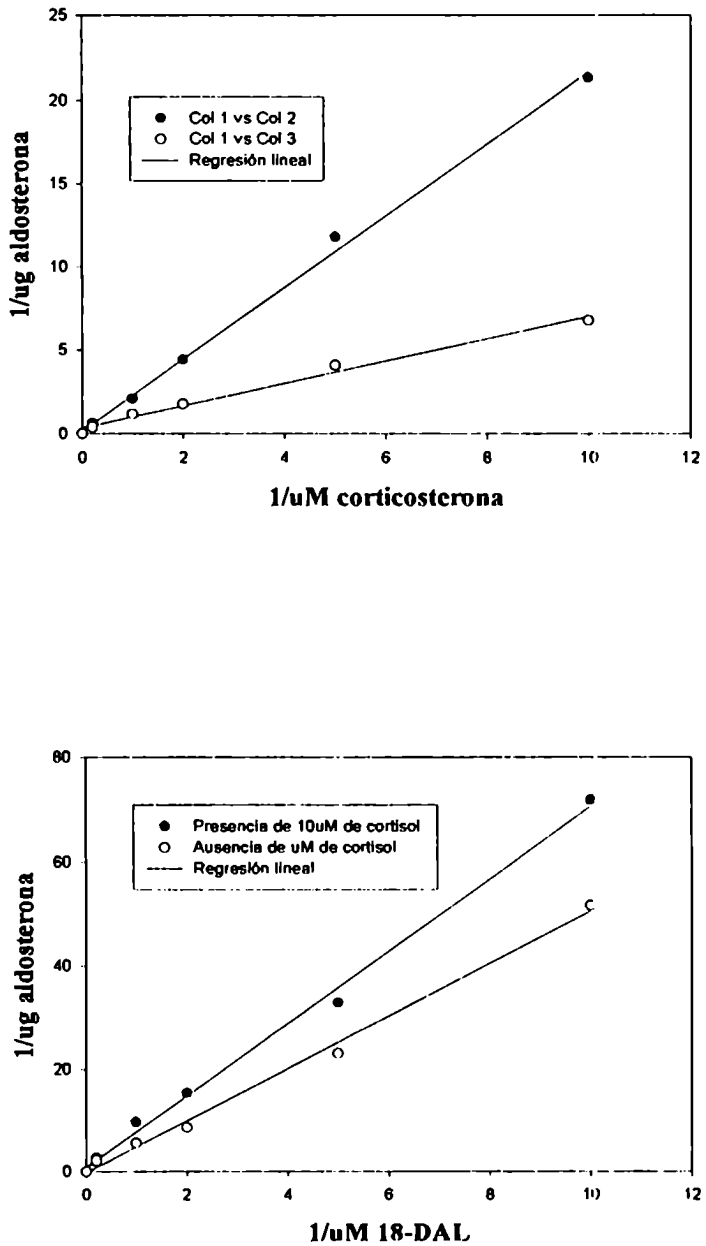


Figura 3.1: Gráficos de Lineaweaver-Burk para la formación de aldosterona a partir de corticosterona (B), en el panel superior y 11,18-epoxycorticosterona (18-DAL), en el panel inferior. En ausencia o en presencia de cortisol 10μM.

En este estudio se han analizado los efectos del sustrato alternativo y extraño al sistema en estudio (cortisol) en el camino descripto anteriormente y que va de 11-deoxicorticosterona a corticosterona, 18-hidroxicorticosterona y aldosterona así como otros caminos entre 11-deoxicorticosterona y aldosterona en la glándula adrenal de rata.

Los pasos inhibidos por el cortisol fueron las transformaciones de corticosterona a 18-hidroxicorticosterona, 18-hidroxicorticosterona a aldosterona, 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona a aldosterona y 11,18-epoxicorticosterona a aldosterona. Estas inhibiciones muestran un comportamiento competitivo, de acuerdo a los gráficos de Lineaweaver-Burk y experimentos de binding. Por otro lado, no se observó inhibición por cortisol en la conversión de 11-deoxicorticosterona a corticosterona y 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona.

Como se ha mencionado en la introducción, se han aislado y clonado dos citocromos P-450 de glándulas adrenales de rata; uno, el CYP11B1, el cual es el responsable de la catálisis de las reacciones de la 11-deoxicorticosterona a corticosterona y 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona las cuales tienen lugar en la zona fasciculata. El segundo citocromo, llamado CYP11B2, solo presente en la zona glomerulosa, es el responsable de la catálisis de estas reacciones pero también posee actividad de metil oxidasa I y metil oxidasa II, como ejemplo de ello tenemos a las actividades de 18hidroxilasa de corticosterona y la de aldosintasa (52;101;102;145-148;150).

No existen dudas sobre la zonación del CYP11B2, siendo diferente para el CYP11B1 con el cuál existe una gran controversia. Mientras algunas publicaciones lo ubican sólo en zona fasciculata-reticularis (97;157;158), otras publicaciones consideran la presencia de esta enzima en esta zona pero también en glomerulosa (95;96;155). Nuestros resultados pueden deberse a la validez de este segundo punto de vista o a contaminación de la preparación con mitocondrias de la zona fasciculata-reticularis. Esta última conclusión puede ser plausible ya que la actividad 11ß-hidroxilación del citocromo CYP11B1 es mucho más alta que la actividad del citocromo CYP11B2. (así sería como una pequeña contaminación de la preparación con mitocondrias de la zona fasciculata podría llevar a una fuerte actividad de 11ß-hidroxilación).

Por otro lado, los resultados demuestran que 11-deoxicorticosterona desplaza -poco pero no significativamente bajo estas circunstancias- la unión específica del cortisol a la mitocondria de adrenal de rata sugiriendo que 11-deoxicorticosterona también se une y consecuentemente se metaboliza por el citocromo CYP11B2, sólo en una pequeña cantidad. Esto concuerda con otros resultados obtenidos por otros grupos de investigación (94;156).

Así como ocurre con receptores y canales (u otras proteínas transportadoras) con los cuales se puede hacer una clasificación de acuerdo a las sustancias que los bloquean o no, también se podría caracterizar a las enzimas de acuerdo a los pasos que serían bloqueados o no por un dado inhibidor. Por lo tanto, para nuestro sistema, las enzimas que caracterizan los pasos desde 11-deoxicorticosterona a aldosterona pueden ser del tipo sensibles a cortisol (SC) o insensibles a cortisol (ISC).

Cada una de estas clasificaciones o características pueden abarcar por lo menos a una enzima ya que no se puede decir nada acerca del número máximo de enzimas involucradas en cada categoría. Las enzimas CYP11B1 y CYP11B2 que fueron caracterizadas por estudios de biología molecular, también podrían caracterizarse en la clasificación ISC y SC respectivamente.

La preparación mitocondrial utilizada convierte eficientemente 11-deoxicorticosterona, corticosterona, 18-hidroxicorticosterona, 18-hidroxi-11-deoxicorticosterona y 11,18-epoxicorticosterona a aldosterona. Paradójicamente la conversión más alta es alcanzada con los dos primeros sustratos, lo cual es en apariencia contradictoria con el hecho de que ambos están antes que 18 hidroxicorticosterona en el camino biosintético a aldosterona. Esta aparente discrepancia es conocida desde hace ya varios años (72) y se asumió que se debe a la alta polaridad del esteroide 18-hidroxilado (20) o a su conformación (72;82).

Una explicación complementaria puede ser que sólo una enzima cataliza la conversión de corticosterona a aldosterona. Bajo este precepto, una vez que se ha formado el intermediario 18-hidroxicorticosterona, este puede ser convertido directamente a aldosterona sin dejar a la enzima, entonces cuando el esteroide intermedio es agregado exogenamente, puede estar impedido de alcanzar la conformación correcta para unirse al sitio activo de la enzima. Esta conformación puede ser del tipo 11,18-epoxicorticosterona. La última hipótesis está fuertemente sostenida por estudios de biología molecular que han demostrado que solamente una enzima (18-hidroxilasa-aldosterona sintasa, CYP11B2) es la que está involucrada en la transformación de corticosterona a aldosterona (52;101;102;145-148;150).

Además el paso 11,18-epoxicorticosterona a aldosterona no fue realizado con citocromos P-450 clonados o aislados.

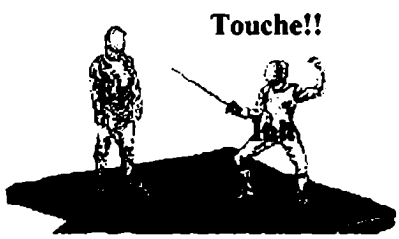
Es bien aceptado que el camino principal de 11-deoxicorticosterona a aldosterona incluye la secuencia de los intermediarios corticosterona y 18-hidroxicorticosterona (145). De todas formas otros caminos también fueron propuestos (168;169). Uno de estos caminos alternativos

incluye la participación de 11,18-epoxicorticosterona (82). Los resultados encontrados muestran que este esteroide es transformado a aldosterona por la mitocondria de la zona glomerulosa de la glándula adrenal de rata, y esta transformación baja en presencia de cortisol. Por otro lado, 11,18-epoxicorticosterona muestra un perfil similar en sus efectos sobre el metabolismo de 11-deoxicorticosterona y corticosterona que cortisol (Tablas 3.3 y 3.4). En efecto el agregado de 11,18-epoxicorticosterona a la incubación de 11-deoxicorticosterona con mitocondria de adrenal de rata aumenta levemente la producción de corticosterona y disminuye la producción de aldosterona por el mismo sustrato.

Paralelamente a estos resultados, se ha visto que la conversión de 11,18-epoxicorticosterona a aldosterona es llevada a cabo por una enzima SC, por ejemplo una enzima perteneciente a la misma categoría que los CYP11B2.

Con los resultados obtenidos en el laboratorio, uno se podría formular la siguiente pregunta: Es el cortisol o uno de sus metabolitos responsable de los efectos aquí descriptos?
La respuesta parece simple y apunta al cortisol. En efecto, el cortisol se une a la mitocondria de la glándula adrenal y su unión no se produce en presencia de ditionito de sodio, lo cual sugeriría que el esteroide está unido a la forma activa (oxidada) del citocromo P450. Por otro lado, el principal metabolito aislado de las incubaciones con cortisol con mitocondrias parece ser 18-hidroxicortisol, pero su conversión es muy pobre (aproximadamente el 4%) y su unión a la mitocondria adrenal es más baja que para el cortisol (118). Finalmente, por gráficos de Lineweaver-Burk se vio que en la mitocondria de la glándula adrenal, al igual que en la de la vaca y en la del pato (118;160) cortisol se comporta como un inhibidor competitivo para el metabolismo de corticosterona a aldosterona.

Estos resultados confirmarían por primera vez a través de experimentos metabólicos, llevados a cabo sobre mitocondrias intactas, resultados similares a los encontrados por biología molecular (52;101;102;145-148;150).



INHIBIDORES SUICIDAS

Capítulo 4 Un modelo simple para la interpretación cinética de inhibidores suicidas

4.1 Introducción

Las inhibiciones enzimáticas basadas en mecanismos no reversibles, también llamados inhibiciones dependientes del tiempo o inhibiciones suicidas, son armas útiles en el estudio de los caminos metabólicos. En estas reacciones, el inhibidor se une covalentemente en el sitio activo de la enzima (170-173), bloqueando irreversiblemente el acceso del sustrato a dicho sitio. Dado que, la unión es de tipo covalente e irreversible, la enzima que posee este inhibidor unido se encuentra permanentemente inactiva. Unicamente la síntesis "de novo" de la enzima puede restaurar la actividad enzimática de la célula.

Es lógico entonces pensar que cuanto más tiempo esté actuando el inhibidor, más grande será la inhibición; de ahí la denominación de dependiente con el tiempo.

Se han realizado muchos ensayos para poder determinar si un inhibidor sintético podría actuar como inhibidor suicida. La estrategia utilizada para el diseño esperimental consiste en la inclusión de un determinado grupo reactivo en la molécula de sustrato, permitiendo asi una reacción covalente con el sitio activo de la enzima. Se debe tener en cuenta que el grupo reactivo no debe cambiar demasiado la estructura del sustrato ya que de otra forma cambiaría la afinidad de la enzima por el sustrato haciéndola, probablemente, mucho menor. También debe tenerse en cuenta, que este nuevo grupo adicionado a la molécula de sustrato no debe ser muy reactivo de manera tal de formar uniones covalentes con otras moléculas de la célula. Entonces, cuál o cuáles deberían ser estos grupos? El grupo ideal será aquel que se haga reactivo sólo por la acción enzimática, cuando el sustrato se una al sitio activo de la enzima, permitiendo asi que la reacción covalente tenga lugar durante la reacción metabólica (129;132;174;175). Teniendo estos lineamientos para la síntesis de un inhibidor suicida es que Merrell Dow ha sintetizado una serie de inhibidores relacionados con sustratos esteroideos con grupos acetilénicos reactivos. En el caso de estos inhibidores, se ha probado diferentes grupos funcionales que generan una inhibición suicida tal es el caso de por ejemplo grupos etinilos o metilos (176) o grupos fenilos (177), aril acetilenos (178). En nuestro caso se utilizó un derivado etinílico de 11-

desoxicorticosterona (18-etinil-11-desoxicorticosterona (18-EtDOC)) como inhibidor suicida (129;175). En la Figura 4.1 se puede ver como reaccionan los grupos acetilenos cuando se oxidan.

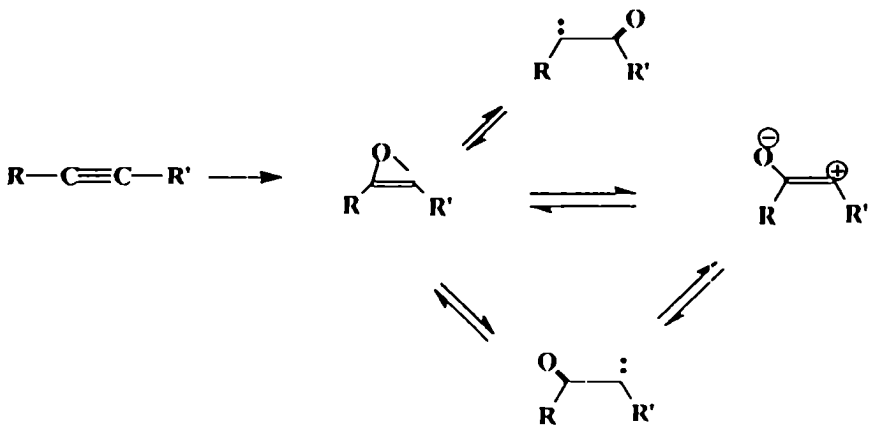


Figura 4.1: Esquema de las especies reactivas formadas a partir de la oxidación de un grupo acetileno.

Las evidencias sugieren que los sustratos acetilénicos se unen covalentemente al grupo hemo de la proteína durante la oxidación de la triple ligadura producida por la enzima. El oxígeno transferido por la enzima a la triple ligadura genera especies activas que reaccionan con el grupo hemo de la enzima catalizando su formación. El oxianión formado permanecerá ligado al hierro del grupo hemo en forma covalente(172). Este tipo de unión propuesta es interesante ya que tiene en cuenta la participación catalítica de la enzima, la estereoquímica del aducto formado y la especificidad del proceso (179).

El modelo matemático más conocido para el estudio de inhibidores suicidas presupone la competencia entre estos con el sustrato principal, sin establecerse la variación simultánea en la concentración de la enzima (180)

En este trabajo se intenta presentar un modelo simple para el estudio de la acción y potencia de los inhibidores suicidas relacionándolo con la conversión enzimática de 11-deoxicorticosterona a aldosterona (DOC→ALDO) usando como inhibidor suicida 18-etinil-11-deoxicorticosterona (18-EtDOC) en ratas.

4.2 Enfoque experimental para la validación del modelo matemático

El protocolo seguido para los ensayos con el inhibidor suicida fue el siguiente: se incubaron cantidades idénticas de la enzima a inhibir -en este caso obtenida de la fracción mitocondrial de la cápsula adrenal- en presencia o ausencia del inhibidor suicida. La fuente de la enzima luego fue lavada para separar el inhibidor no unido a la misma, y luego se midieron las velocidades iniciales incubando con el sustrato específico en ausencia del inhibidor suicida libre. Estas velocidades fueron comparadas con las velocidades del control (enzima incubada sin inhibidor) para así determinar la cantidad de actividad enzimática perdida debido a la acción del inhibidor.

El modelo matemático usado para la interpretación de estos resultados se detalla a continuación.

4.3 Modelo matemático

La reacción irreversible entre una enzima (E) y su inhibidor puede ser representada como:

$$E + I \xrightarrow{k} EI$$

donde k es la constante específica de velocidad.

La velocidad de reacción puede expresarse como:

$$\frac{d(EI)}{dt} = k(E)(I) \qquad (1)$$

donde *(EI)*, *(E)* y *(I)* representan las concentraciones de complejo enzima-inhibidor, enzima libre e inhibidor libre respectivamente, a un tiempo *t* de iniciada la reacción.

Los balances de masa para la enzima y para el inhibidor resultan ser:

$$Eo = (E) + (EI) \qquad (2)$$

y

$$Io = (I) + (EI) \qquad (3)$$

donde *Eo* e *Io* son las concentraciones iniciales de la enzima y del sustrato.

Reemplazando (E) y (I) de la ecuación 1 por los hallados por balance de masa (ecuaciones 2 y 3), se obtiene:

$$\frac{d(EI)}{dt} = k(Eo - (EI))(Io - (EI))$$

Reordenando la ecuación diferencial e integrando *dt* entre el tiempo cero y un tiempo *t* (equivalente al tiempo al que estuvo expuesta la enzima al inhibidor suicida) y *d(EI)* entre cero y una concentración *EI* del complejo enzima-inhibidor, se tiene que:

$$\int_0^{EI} \frac{d(EI)}{(Eo - (EI))(Io - (EI))} = k\int_0^t dt \qquad (4)$$

resolviendo la integral tendré que:

$$\frac{1}{Eo - Io} \ln \frac{1 - \frac{(EI)}{Eo}}{1 - \frac{(EI)}{Io}} = kt \qquad (5)$$

La ecuación (5) muestra una relación entre *(EI)* y *t*. Si se asume que la concentración inicial de inhibidor es mucho mayor que la concentración inicial de la enzima (*Io>>Eo*) entonces se podría despreciar *Eo* frente a *Io* quedándonos entonces que el *ln* debe ser negativo para que se siga cumpliendo la igualdad. Para que esto ocurra deberá suceder que:

$$1-\frac{(EI)}{Eo}(1-\frac{(EI)}{Io}$$

Lo que implica que a medida que el tiempo aumenta (por la ecuación 5), la cantidad

$$\ln\frac{1-\frac{(EI)}{Eo}}{1-\frac{(EI)}{Io}}$$

decrece. Si ahora suponemos una cantidad $(EI)_1$ como la concentración de complejo enzima sustrato a un tiempo t_1 y $(EI)_2$ como la concentración del complejo enzima sustrato a un tiempo t_2, se verá que para un tiempo t_2 tal que $t_2>t_1$ se cumple que:

$$\frac{1-\frac{(EI)_1}{Eo}}{1-\frac{(EI)_1}{Io}} \geq \frac{1-\frac{(EI)_2}{Eo}}{1-\frac{(EI)_2}{Io}} \qquad (6)$$

Se debe asumir que $Io>Eo$, como así también que (EI) varia de $(EI)_1$ a $(EI)_2$ para un tiempo $t_1 < t_2$. Para un determinado intervalo de tiempo se ve que el numerador de la ecuación (6) varia más que el denominador. Por lo tanto, la ecuación (6) será sólo válida si $(EI)_2>(EI)_1$. Este resultado nos conduce a una inhibición que es dependiente del tiempo ya que (EI) aumenta con el incremento de t.

Si se asume que $Io>Eo$ para la ecuación (5), podemos llegar a la misma conclusión. Por lo tanto se puede decir que la ecuación 5 parecería describir el comportamiento del inhibidor suicida.

La constante de velocidad k es independiente de Io y Eo. así que, cambiando Io y E diferentes experimentos se puede obtener una familia de lineas rectas paralelas.

El uso de la ecuación (5) requiere conocer (EI), que puede ser medido usualmente por conteo radioactivo u otros métodos directos de medición de ligando unido. Aquí podría ser imposible de medir directamente, entonces se verá en la siguiente sección cómo se puede salvar este inconveniente.

4.4 Medición de *(EI)*

Ya se ha dicho que el protocolo usado establece que después de incubar a la enzima con el inhibidor durante un tiempo *t*, alcanzando una concentración de complejo enzima-sustrato igual a *(EI)*, se lava a la misma del inhibidor libre y se mide la velocidad inicial de la reacción enzimática. El siguiente desarrollo matemático está basado en enzimas Michaelianas para simplicidad.

El esquema general de reacción para una enzima que cumple con una cinética de Michaelis Menten es:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

donde la velocidad estaría dada por:

$$V = \frac{V\,\max}{1 + \frac{K_M}{S}} \qquad (7)$$

donde $Vmax = k_3\,Eo$; $K_M = (E)(S)/(ES)$ en estado estacionario; y V es la velocidad inicial medida en el experimento si S es la concentración inicial del sustrato específico.

El balance de masa en la reacción enzimática da como resultado que $Eo = (E) + (ES)$. Luego de la incubación con el inhibidor, el término *(EI)* se suma a la ecuación dando de esta forma que el balance de masa sea: $Eo = (E) + (ES) + (EI)$ donde *(EI)* es ahora una constante ya que se ha removido el inhibidor libre en solución, y la unión de *I* a *E* es irreversible.

La velocidad inicial luego del tratamiento con el inhibidor suicida (V_w) es entonces:

$$Vw = \frac{dP}{dt} = k_3(ES) = k_3[(Eo - (E) - (EI)] = k_3[Et - \frac{K_M(ES)}{(S)} - (EI) = k_3Et - \frac{k_3(ES)K_M}{(S)} - k_3(EI)$$

$$Vw = \frac{V\max - k_3(EI)}{1 + \frac{K_M}{(S)}} \qquad (8)$$

La ecuación 8 representa la velocidad inicial de la reacción enzimática tomándola como una reacción que cumple con Michaelis-Menten luego del tratamiento con el inhibidor suicida.

Comparando esta ecuación con la ecuación (7) se puede notar que el K_M permanece inalterado luego del tratamiento con el inhibidor suicida. Sólo la velocidad inicial, V_w decrece en una cantidad igual a $k_3(EI)/(1+K_M/S)$. El denominador de la ecuación (7) y de la ecuación (8) es idéntico, pero habría que hacer notar que para realizar cualquier comparación entre la enzima pretratada y la no tratada con el inhibidor se debe mantener la concentración de sustrato *(S)* igual en las dos situaciones, de otra forma sería imposible cancelar los dos denominadores.

Si ahora se realiza el cociente de "la ecuación (8)/la ecuación (7)" se obtendrá la relación V_w/V , o sea la velocidad inicial de la enzima tratada con el inhibidor suicida respecto de la velocidad inicial de la enzima sin tratar. Se tendrá que tener en cuenta que sólo se puede realizar esto si la concentración del sustrato se mantiene igual en ambos casos. Esta relación resultará:

$$\frac{Vw}{V} = \frac{V\max - k_2(EI)}{V\max}$$

y si reordenamos:

$$\frac{Vw}{V} = 1 - \frac{k_2(EI)}{V\max} = 1 - \frac{k_2(EI)}{k_2 Eo} = 1 - \frac{(EI)}{Eo}$$

despejando *(EI)* se obtendrá:

$$(EI) = Eo[1 - \frac{Vw}{V}]$$

y si llamamos R a la relación V_w/V, se verá que:

$$R = \frac{Vw}{V} = 1 - \frac{(EI)}{Eo} \quad (9)$$

Sustituyendo esta cantidad en la ecuación (5), se verá que:

$$\frac{1}{Eo - Io} \ln[\frac{R}{1 - \frac{(EI)}{Io}}] = kt$$

Aqui se debe asumir que $Io>>Eo$. Y siendo así, se tendrá entonces que $Eo\text{-}Io \cong Io$ y $(EI)/Io \cong 0$. Haciendo estas aproximaciones, se obtiene que:

$$\ln\frac{Vw}{V} = -kIot \quad (10)$$

donde hemos llegado a una ecuación que depende del tiempo. Nótese que en la ecuación original la relación era entre (EI) y t, mientras que en este caso es entre V_w/V y el tiempo.

Esta relación corresponde a una linea recta de punto de intersección con el eje y en cero y de pendiente negativa. El valor de la constante de velocidad k puede obtenerse a partir del cálculo de la pendiente de dicha recta ($-kIo$).

A distintas concentraciones iniciales de inhibidor (Io) se obtendrá una familia de rectas que poseen la misma ordenada al origen y que difieren sólo en su pendiente. Es de hacer notar que la ecuación (10) no depende de la concentración de sustrato inicial (siempre sólo teniendo en cuenta que esta concentración sea la misma para las dos reacciones) y entonces se puede decir que será válida para concentraciones tanto saturantes como no saturantes de sustrato.

Si la velocidad de la reacción enzimática se mide a tiempos muy largos se puede inferir que la relación dejará de ser lineal. Esto puede deberse a dos razones. La primera es que el complejo (EI) podría ser metabolizado (especialmente si se están realizando las incubaciones con organelas o células), de esta forma la concentración de (EI) no sería constante en el tiempo que dure la incubación. La segunda razón es que podría sintetizarse nuevamente la enzima y de esta forma aumentar la cantidad de Eo. Estos dos inconvenientes podrían minimizarse usando enzima purificada. Estos dos efectos causarían que el término de la derecha sea más grande que el

calculado teóricamente, y esto daría una desviación positiva de la linealidad a medida que t aumenta.

Cuando la velocidad con inhibidor es igual a la mitad de la velocidad control se tiene que:

$$\ln \frac{Vw}{V} = \ln \frac{1}{2} = -k * Io * t_{1/2}$$

dando que:

$$t_{1/2} = \frac{0.301}{kIo} \qquad (11)$$

La ecuación (11) se puede usar también para calcular k, midiendo $t_{1/2}$ a distintas concentraciones de inhibidor, y graficando $t_{1/2}$ vs. $1/Io$.

4.5 Materiales y Métodos

Los esteroides radioinertes, los componentes de los buffers de incubación y la BSA (fracción V) fueron comprados a Sigma Chemical Co. Los solventes orgánicos fueron de grado analítico. El inhibidor suicida, 18-etinil-DOC fue provisto por los laboratorios Merrol Dow.

4.6 Preparación e incubación de las mitocondrias

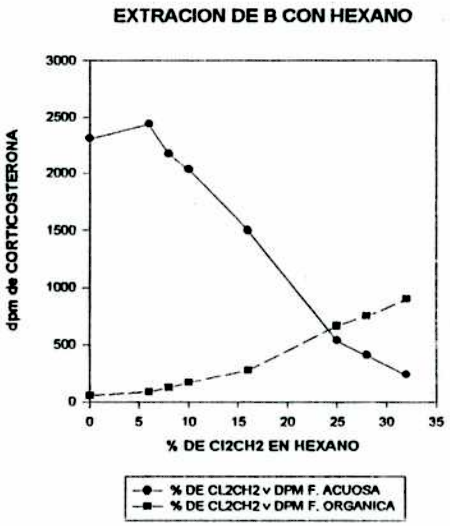
Para estos ensayos se usaron ratas machos CHBB-Thom de peso entre 150 y 200 g, las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Se les extrajo rápidamente las glándulas adrenales y se colocaron en solución salina fría, se limpiaron de la grasa que las recubre y finalmente se las decapsuló. Se homogeneizaron las cápsulas adrenales en un buffer Krebs-Ringer-bicarbonato-glucosa (82) (pH=7.2), y se separaron las mitocondrias por centrifugación como ya fue descripto anteriormente (76) (Ver sección 2.2). Usando el mismo buffer se resuspendió el pellet mitocondrial y se tomaron alícuotas conteniendo 0.6mg de proteínas cada una para usarlas en las distintas incubaciones como fuente de enzima.

La preparación mitocondrial se preincubó en presencia de vehículo (DMSO) o 18-etinil-DOC, como inhibidor suicida. Luego de este pretratamiento, se sometió a las muestras a un lavado, centrifugando a 10.000g durante 15 minutos a 4°C y resuspendiendo el pellet en el mismo buffer de incubación sin el inhibidor suicida. Se repitió este paso una vez más. Luego, el pellet así obtenido se resuspendió nuevamente en el mismo buffer de incubación agregando el esteroide radioinerte, sustrato de la reacción enzimática. Se inició la incubación con el agregado de 0.5mM de NADPH y se finalizó mediante la colocación de los tubos de incubación en baño de hielo-agua durante 15 minutos. Se utilizó los sobrenadantes de incubación para las determinaciones de producto formado. En algunos experimentos como se verá más adelante se han omitido los lavados mitocondriales luego de la interacción con el inhibidor suicida.

4.7 Determinación de los esteroides

Aldosterona se determinó por técnicas de radioinmunoensayo (137)(Sección 2.7 y 2.8) Para la determinación cuantitativa de corticosterona se utilizó también el método de radioinmunoensayo siguiendo la técnica descripta anteriormente (138)(Sección 2.9).

Para la medición de corticosterona por radioinmunoensayo se necesita extraer primero 11-deoxicorticosterona, y que fue agregada como sustrato que posee alta reacción cruzada con corticosterona en la técnica a utilizar. Para ello se procedió a buscar un solvente o mezcla de solventes que extrajeran DOC pero no B. Se estudió qué ocurría con distintas mezclas de hexano y cloruro de metileno en donde se variaba la proporción de este último solvente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2. Dado los datos obtenidos se eligió trabajar con hexano puro ya que si aumento la proporción de $Cl_2C_2H_2$, aumenta también la extracción de corticosterona (pierdo corticosterona), mientras que no tengo una mejora en la extracción de 11-desoxicorticosterona. Por lo tanto, se procedió a extraer DOC del sobrenadante de la incubación mediante dos extracciones sucesivas con 1ml de hexano.



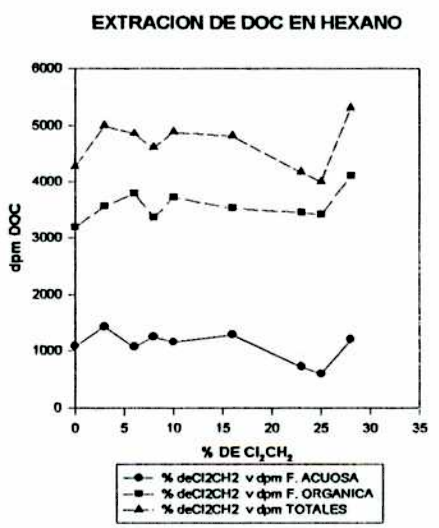


Figura 4.2: Extracciones de DOC y B con mezcla de hexano y cantidades variables de cloruro de metileno.

4.8 Misceláneas

La solución "stock" del inhibidor suicida, 18-EtDOC, se preparó de manera tal que resulte 5mM en DMSO. Los esteroides radioinertes usados como sustrato, así como el cortisol, fueron agregados a la mezcla de incubación disueltos en el mismo buffer del ensayo que se describió anteriormente.

Para la medición de proteínas se utilizó el método de Bradford (140).

4.9 Resultados

Al preincubar las mitocondrias de la adrenal de rata en buffer de incubación a partir de DOC, se observa que la producción de aldosterona decrece a medida que el tiempo de preincubación aumenta. Estos resultados estarían reflejando la aparente inestabilidad del citocromo P450 involucrado en la biosíntesis de la aldosterona (181;182). Por esta razón, se tuvo que tener en cuenta controles específicos (uno para cada tratamiento) en los protocolos diseñados para estudiar los efectos de diferentes agentes a lo largo del tiempo.

La Tabla 4.1 muestra la inhibición producida por el inhibidor suicida 18-EtDOC a distintos tiempos de incubación sobre la producción de aldosterona, en la conversión de 11-desoxicorticosterona a aldosterona, usando como fuente de enzima mitocondrias de cápsula de glándula adrenal de rata.

TIEMPO	pg de aldosterona /100µl de Inc.	
	Inh. 18-EtDOC	Inh. CORTISOL
0	312.60 ±31.00	313.50 ± 39.60
30	92.00 ± 9.00	21.62 ± 2.60
60	46.00 ± 4.00	6.21 ± 0.71
90	22.00 ± 2.20	5.85 ± 1.26
120	5.90 ± 0.50	5.75 ± 1.16

Tabla 4.1: Efecto de la inhibición por 18-EtDOC y de cortisol sobre la producción de aldosterona, en la conversión DOC → ALDO. Concentración de DOC utilizada 1µM. Temperatura de incubación 37°C, concentración de los inhibidores 18-EtDOC y cortisol: 10µM.

Se puede observar, como comparación, la inhibición producida por el cortisol, un inhibidor competitivo (183), sobre la misma reacción y usado a igual concentración que 18-EtDOC. Cortisol no posee una inhibición dependiente del tiempo.

Se comprobó que la inhibición producida por 18-EtDOC es también dosis-dependiente como se puede apreciar en la Tabla 4.2.

El inhibidor suicida también disminuye la cantidad de aldosterona formada a partir de corticosterona y 18 hidroxi-DOC.

(18-EtDOC) (μM)	ALDOSTERONA (ng/Inc.)
0	5.80 ± 0.50
0.10	4.50 ± 0.40
1.00	0.47 ± 0.04
10.00	0.15 ± 0.01
50.00	0.01 ± 0.000

Tabla 4.2: Se muestra la dosis dependencia de la inhibición por 18-EtDOC en la producción de aldosterona a diferentes dosis de inhibidor suicida. Concentración de DOC utilizada 1μM. Temperatura de incubación 37°C. Tiempo de incubación 60 minutos.

La producción de aldosterona a partir de DOC involucra la producción de un intermediario, corticosterona. Por lo tanto, se procedió a medirlo en las incubaciones estudiadas anteriormente. La Figura 4.3 muestra que los niveles de corticosterona permanecieron constantes durante los experimentos de inhibición con 18-EtDOC. De esta forma la inhibición en la producción de aldosterona se debería a la acción del inhibidor entre corticosterona y aldosterona.

Todos estos experimentos fueron realizados lavando el inhididor libre de la preparación enzimática antes de la adición del sustrato específico. (11-desoxicorticosterona).

Cuando la fuente enzimática se incuba en presencia de 1μM de DOC luego del tratamiento con cortisol ó 18-EtDOC sin lavado previo del inhibidor se observa que la cantidad de aldosterona decrece con respecto a los controles (Tabla 4.3). Por otro lado, si se compara con la transformación a aldosterona a partir de DOC luego del lavado (para la eliminación del inhibidor suicida o el cortisol) se observó que sólo el último fue capaz de inhibir la reacción enzimática.

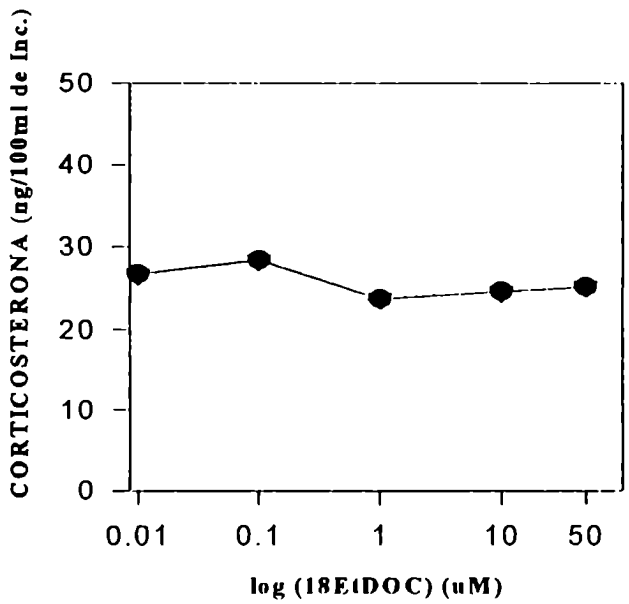


Figura 4.3: : Se muestra la constancia en los niveles de corticosterona durante la inhibición por 18- EtDOC a diferentes dosis de inhibidor suicida. Concentración de DOC utilizada 1μM. Temperatura de incubación 37°C. Tiempo de incubación 60 minutos.

TRATAMIENTO	LAVADO	ALDO	% INHIBICION
VEHICULO		23.76 ± 2.44	-
CORTISOL		19.13 ± 4.53	19.5
18EtDOC	-	3.37 ± 0.77	85.8
VEHICULO		2.15 ± 0.24	
CORTISOL		2.34 ± 0.35	
18EtDOC		1.06 ± 0.11	50.7

Tabla 4.3: Estudio de la influencia del lavado posterior al tratamiento con el inhibidor, ya sea 18-EtDOC o cortisol. Conversión DOC –> ALDO. Concentración de DOC utilizada 1μM.Temperatura de incubación 37°C, concentración de los inhibidores 18-EtDOC y cortisol: 10μM.

Estos resultados indicarían que el cortisol (inhibidor competitivo, reversible) necesita estar presente para ejercer su acción inhibitoria, mientras que 18-EtDOC (inhibidor suicida, irreversible) no.

Por otro lado y en otro orden de observaciones, la producción basal (vehículo, Tabla 4.3) de aldosterona disminuye fuertemente con el lavado.

El cofactor del citocromo P-450 es NADPH para las reacciones de hidroxilación en el camino de DOC a ALDO. Las preincubaciones mitocondriales con NADPH disminuyen la producción de aldosterona a partir de DOC probablemente debido a la oxidación de la enzima. Al incubar en presencia de 18-EtDOC se produce el mismo efecto sobre la reacción con o sin la presencia de NADPH. Tabla 4.4.

PREINCUBACION	TRATAMIENTO CON 18EtDOC	ALDOSTERONA	TRATADO/CONTROL
VEHICULO		883.5 ± 129.4	0.213
VEHICULO	+	188.5 ± 98.83	
NADPH	-	197.25 ± 62.21	0.216
NADPH	+	42.67 ± 14.22	

Tabla 4.4: Estudio de la influencia de NADPH durante el tratamiento con el inhibidor 18-EtDOC Conversión DOC → ALDO. Concentración de DOC utilizada 1μM.Temperatura de incubación 37°C, concentración del inhibidor 18-EtDOC 10μM.

También se probó el efecto de 18-EtDOC sobre la actividad del citocromo $P450_{scc}$ o sea, sobre la transformación de colesterol a pregnenolona. Lo observado fue que 18-EtDOC no

disminuye la actividad enzimática o sea no sería un inhibidor de la 20,22 desmolasa enzima responsable de la catálisis de este paso, mostrando así especificidad (Tabla 4.5).

Finalmente el modelo matemático descripto para un mecanismo basado en la inhibición suicida concuerda con los resultados obtenidos.

TRATAMIENTO	PREGNENOLONA
VEHICULO	1628.50 ± 508.41
18EtDOC	1590.74 ± 402.18

Tabla 4.5: Estudio de la influencia del inhibidor 18-EtDOC en la conversión colesterol → pregnenolona. Concentración de colesterol utilizada 1μM.Temperatura de incubación 37°C, concentración del inhibidor 18-EtDOC 10μM.

En las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se puede observar la representación gráfica de la ecuación (10) para la producción de aldosterona a partir de DOC, corticosterona y 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona y por otro lado corticosterona a partir de DOC. Como lo predice el modelo matemático, se obtiene una linea recta pudiéndose calcular la constante de velocidad de su pendiente.

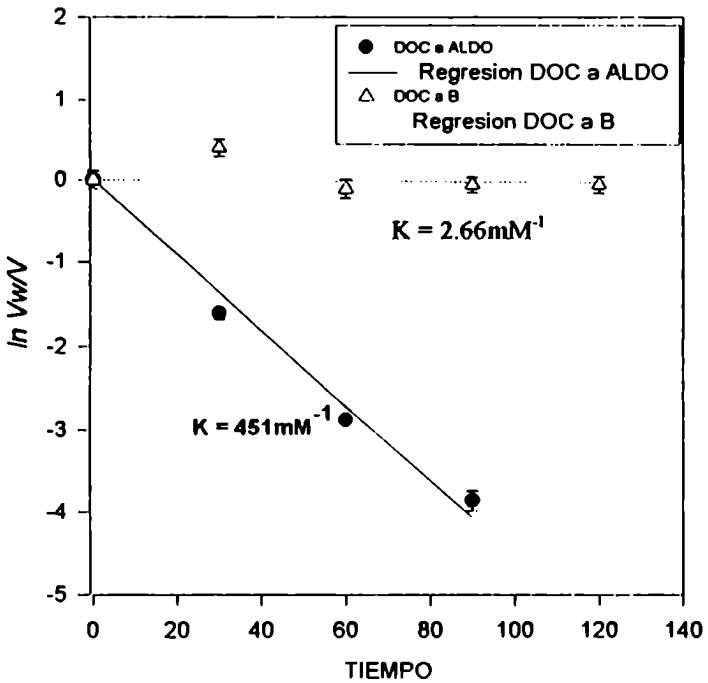


Figura 4.4: Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión DOC a ALDO y DOC a B. Concentración de DOC utilizada 1μM.Temperatura de incubación 37°C, concentración del inhibidor 18-Et.DOC 10μM.

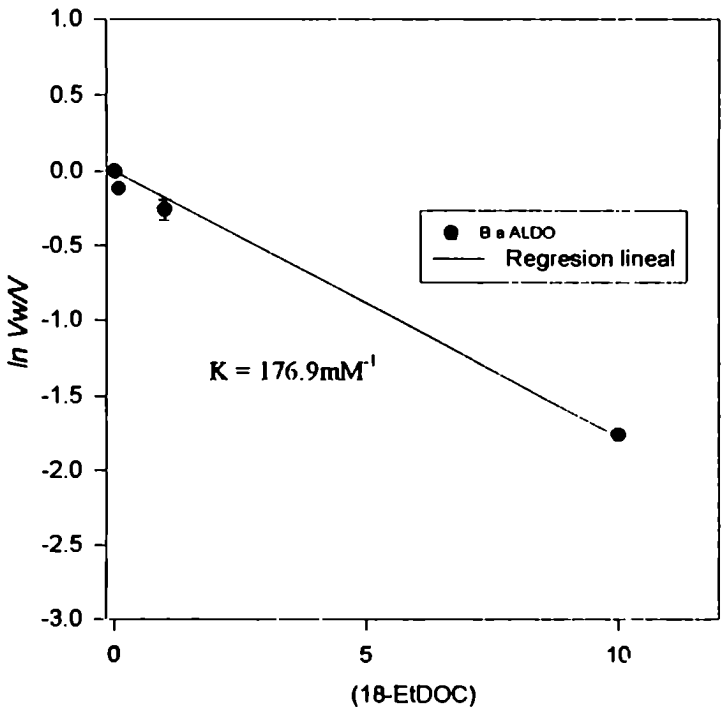


Figura 4.5: Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión corticosterona → aldosterona. Concentración de DOC utilizada 1μM. Temperatura de incubación 37°C, tiempo de incubación 40 minutos.

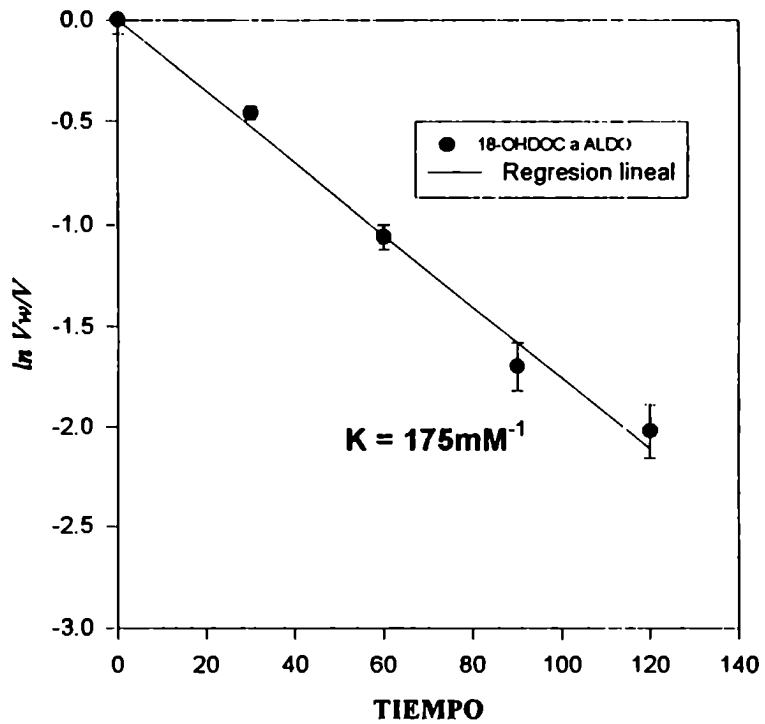


Figura 4.6: Representación gráfica de la ecuación (10), estudiando la conversión 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona → aldosterona. Concentración de DOC utilizada 1μM. Temperatura de incubación 37°C, concentración del inhibidor 18-EtDOC 10μM.

4.10 Discusión

Se observa que 18-etinilDOC se comporta como un inhibidor suicida en su efecto inhibitorio sobre la producción de aldosterona a partir de DOC, 18-OHDOC y B ya que su acción: i) es dependiente del tiempo (Tabla 4.1); ii) es irreversible. Esta última conclusión puede obtenerse debido a que el efecto inhibitorio no desaparece con el lavado de los preincubados.

Se probó que el cortisol es un inhibidor competitivo en la producción de aldosterona a partir de 11-desoxicorticosterona en las preparaciones de adrenales de rata. Esta inhibición se pierde cuando se procede a lavar la solución en estudio después del agregado de DOC.

Comparando los resultados obtenidos para cortisol y para 18-EtDOC entre lavar o no lavar los incubados se observa que 18-EtDOC se comporta como un inhibidor no reversible.

Datos preliminares de las acción de 18-EtDOC sobre cultivos celulares de adrenal (175), muestran que la producción de aldosterona aumenta al sacar 18-EtDOC con los lavados posteriores, como resultado de una síntesis "de novo" de proteínas.

La acción inhibitoria producida por 18-EtDOC sobre la biosíntesis de aldosterona a partir de DOC parecería ser específica de un citocromo P450 esteroidogénico, no afectando al $P450_{scc}$ como se muestra en la Tabla 4.5.

El efecto de 18-EtDOC no se pierde cuando la preparación se pretrata con el cofactor NADPH, como se muestra en la Tabla 4.4. De esta manera se sugiere que cuando la actividad basal de la enzima es modificada, el inhibidor sintético ejerce aún su efecto inhibitorio sobre la actividad residual de la misma.

La Tabla 4.6 muestra las diferentes constantes de inhibición para la producción de aldosterona a partir de diferentes sustratos.

REACCION	K (mM^{-1}.min.)
DOC→B	2.66 ± 0.16
DOC→ALDO	451.0 ± 36.0
B→ALDO	176.9 ± 16.5
18OHDOC→ALDO	175.0 ± 15.4

Tabla 4.6: Cálculo de las constantes de inhibición para las diferentes transformaciones. Concentración de los sustratos utilizada 1μM. Temperatura de incubación 37°C, concentración del inhibidor 18-EtDOC 10μM.

Como se puede ver en la Tabla 4.6 el valor de la constante para la transformación 11-desoxicorticosterona a corticoaterona es muy pequeño lo que indicaría escasa o nula acción inhibitoria (Ver también Figura 4.4).

Por otro lado, los valores semejantes para la constante del inhibidor suicida en las traansformaciones corticosterona a aldosterona y 18-hidroxi 11-desoxicorticosterona a aldsoterona, sugerirían que una misma enzima cataliza a ambas. Resulta consistente e interezante que lo mismo pudo ser también concluído en los experimentos con cortisol como inhibidor competitivo (Ver Tabla 3.3 y Discusión del Capítulo 3). Sin embargo por razones metodológicas, no puede descartarse fácilmente que la semejanza entre los resultados para corticosterona y 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona en sus transformaciones a aldosterona (Tabla 4.6 y 3.3) sea debida a un hecho fortuito; pero aún en este último caso debiera concluirse la similitud de los componentes enzimáticos de ambas.

Por último, la diferencia en los valores de las constantes de 18-EtlDOC en su acción sobre los diferentes pasos estudiados (Tabla 4.6), indicaría que al menos dos enzimas son necesarias para transformar 11-desoxicorticosterona en aldosterona, tal cual se habría concluído en el capítulo anterior cuando se estudió las inhibiciones producidas por un inhibidor reversible como lo es el cortisol. Dichas dos enzimas serían CYP11B1 y CYP11B2.

DIMERO DE 18-OHB

Capítulo 5 Transformación no enzimática de 18-hidroxicorticosterona en otros derivados lipofílicos seguidos por espectroscopía de masa, Fast Atom Bombardment.

5.1 Caracterización de un dímero de 18-hidroxicorticosterona.

Los 21-pregnanos 18-hidroxilados son los únicos compuestos -dentro de la familia de los esteroides- capaces de transformarse en otros compuestos menos polares (que el que les dio origen) y derivados. Estas transformaciones pueden poseer distinta naturaleza química: por un lado, a) estos esteroides se transforman en formas cíclicas más estables mediante la formación de puentes éteres del tipo C_{18}-O-C_{20} que conducen a su vez a formas hemiacetálicas con hidroxilos altamente reactivos en la posición C_{20} y C_{21}. Esta propiedad facilita la sustitución por radicales nucleofílicos originando de esta manera acetales. Un segundo grupo de derivados menos polares, b) se forman por la pérdida de agua seguida por la formación de un puente de oxígeno. Un ejemplo de esto sería la formación de un puente entre la posición C_{18} y el C_{11}, similar a aquellas formas menos polares de aldosterona. Este último compuesto requiere por supuesto de la participación de un oxhidrilo en posición C_{11} de la molécula original. La formación de este compuesto puede luego dar origen a un segundo derivado bicíclico que ocurriría a través de una reacción del tipo a). Veamos entonces qué ocurre en el caso de un esteroide específico como la aldosterona. Dependiendo del entorno molecular la aldosterona puede existir en forma de mezcla isomérica o como un tautómero puro. (Figura 5.1), dando origen a formas mono y bicíclicas del tipo de las descriptas en a) y en b). Este mismo tipo de reacción ocurre al colocar 18-hidroxicorticosterona en medio ácido (82). El compuesto resultante es un 11,18-epoxiderivado del 21-ol 4:5-pregnane 3,2-diona, 11,18-epoxi-corticosterona, denominado también 18-desoxialdosterona (18-DAL) (Figura 5.2).

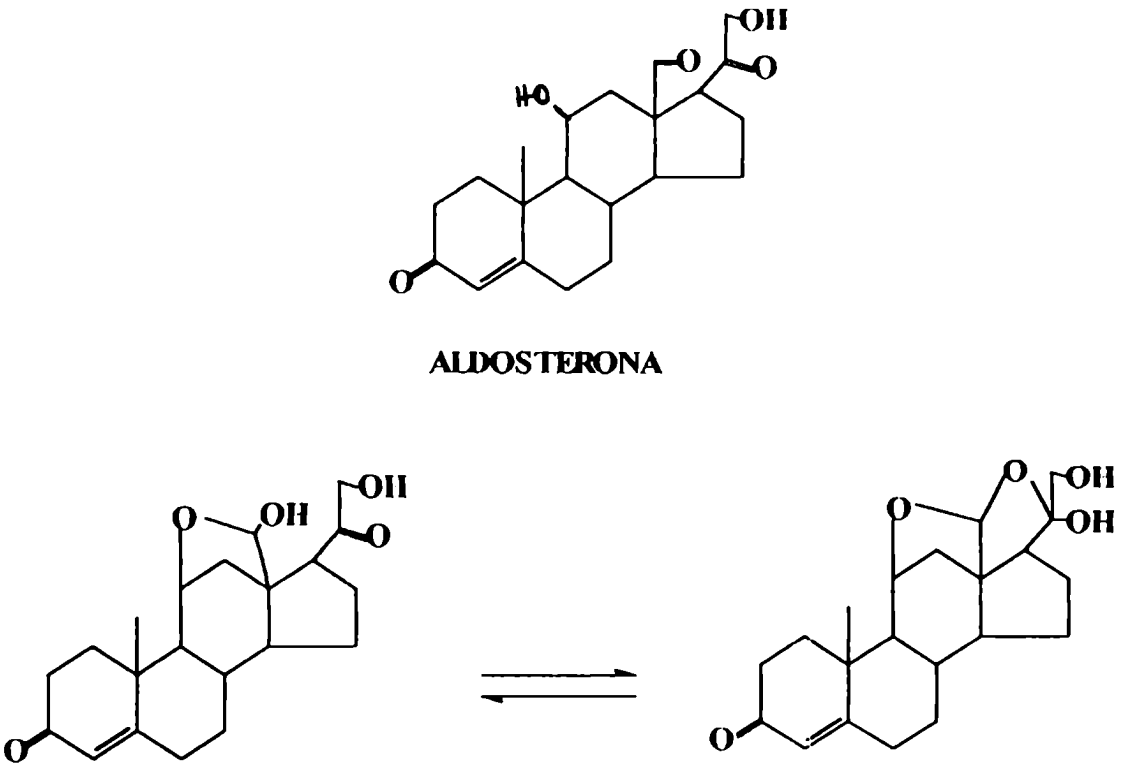


Figura 5.1: Formas tautoméricas de aldosterona, Genard,P. et al (31)

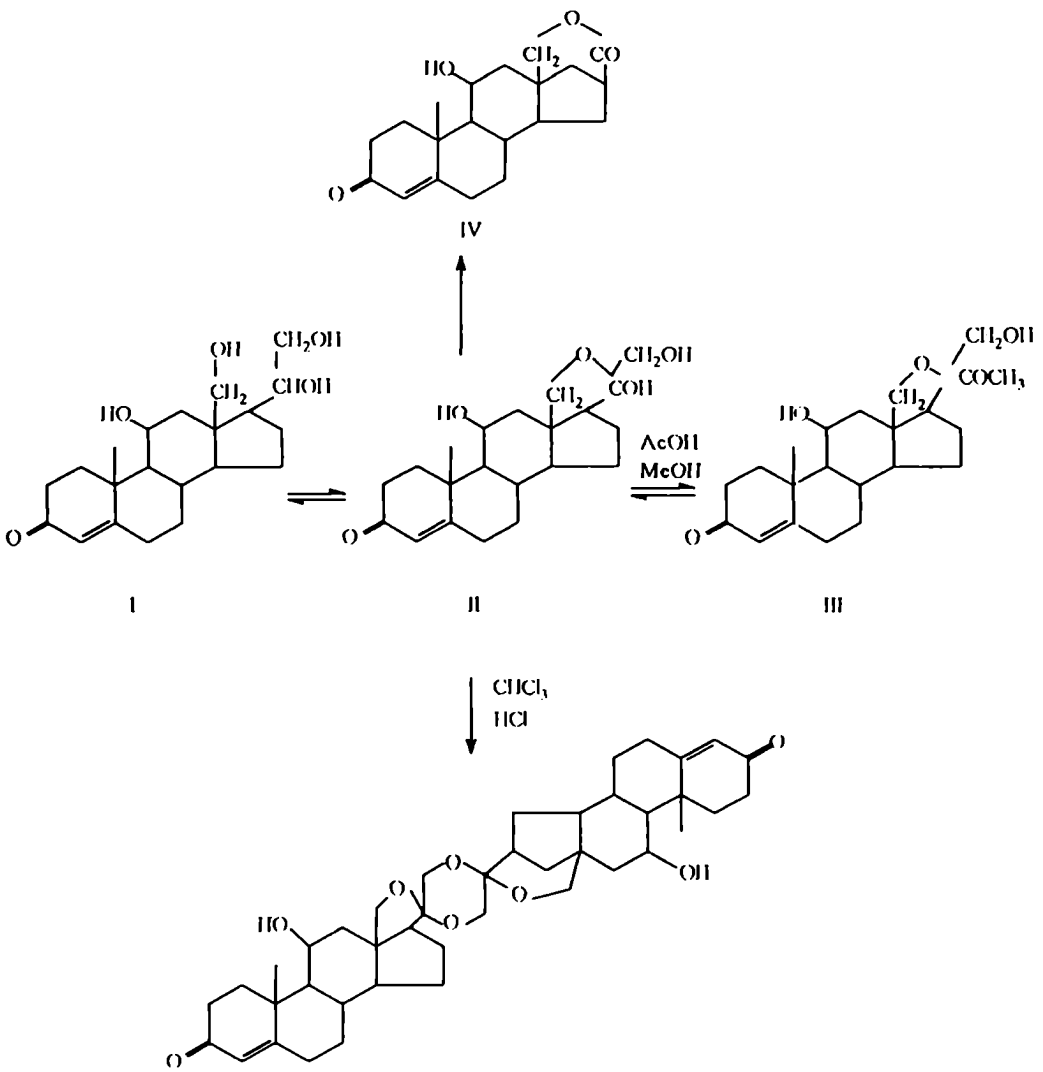
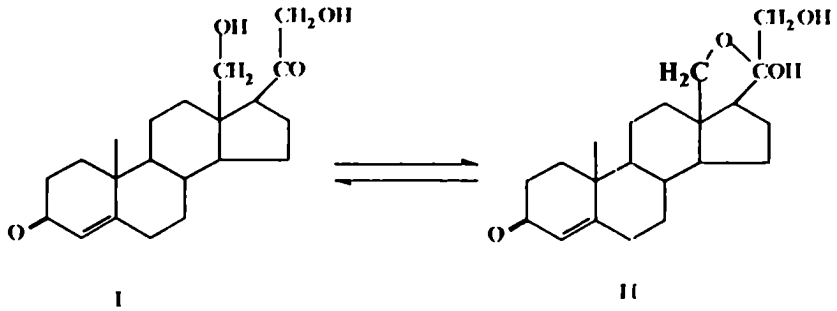
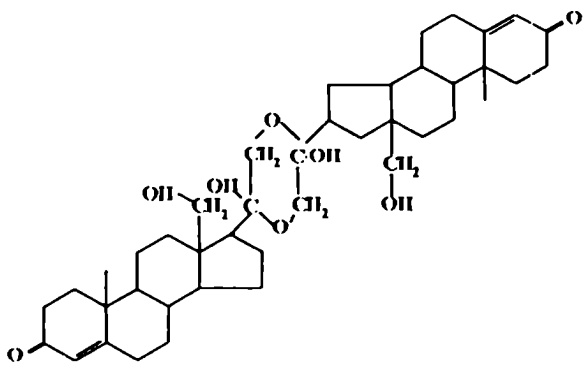
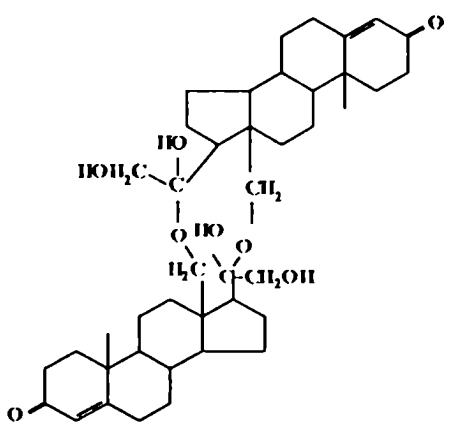


Figura 5.2: 18-hidroxicorticosterona en medio ácido. **I** 18-hidroxicorticosterona, **II** forma hemiacetálica, **III** 20-alcoxiesteroide, **IV** etiolactona, y dímero de 18-hidroxicorticosterona. O'Hare, MJ et al. (184).



I II





IV

Figura 5.3: Formas de 18-OHDOC. I y II formas tautoméricas. III y IV formas diméricas de la misma molécula propuesta por Genard, P. et al. en 1975, (31) y anteriormente por Dominguez, O.V. (185).

Un tercer grupo de derivados menos polares c) son los de naturaleza dimérica. Debido a la inestabilidad de estos dímeros, este grupo no fue profundamente investigado. En el caso de aldosterona, en 1985 Lichtwald, K. et al. demuestran la presencia de un dímero de aldosterona (186) (Figura 5.4), y caracterizado en nuestro laboratorio por Cozza, E.N. et al. (187).

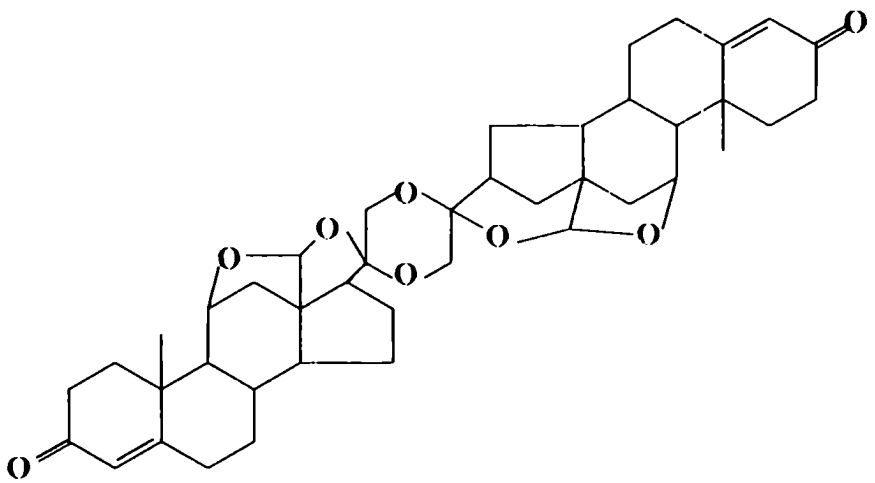


Figura 5.4: Dímero de aldosterona propuesto por Lichtwald, K. et al. en 1985.

En el caso de la 18-hidroxicorticosterona (18-OHB) la evidencia de una forma dimérica fue dada a conocer por Damasco, M.C. et al.(28), quienes separaron por cromatografía en papel seguida de una cromatografía de exclusión molecular, un compuesto lipofílico, obtenido en solución metanólica (probablemente débilmente ácida). En esta columna, conteniendo Sephadex LH20, se observó que todas las formas monoméricas de los esteroides, incluyendo colesterol, corticosterona, 18-hidroxicorticosterona y probablemente los acetales mencionados anteriormente, migraban como un sólo pico, mientras que otros derivados lipofílicos derivados de 18-hidroxicorticosterona y que se formaron durante el tratamiento migraban entre el único pico de esteroides y el pico correspondiente a un compuesto de peso molecular 1000. Años más tarde, Kondo, E. et al. postulan la formación espontánea de un dímero de 18-

hidroxicorticosterona (26). Estos investigadores no dan evidencia experimental de la posible formación de este dímero. El dímero al igual que 18-DAL son postulados como intermediarios de una síntesis combinada, microbiológica y orgánica, de la biosíntesis de aldosterona por las glándulas adrenales de ratas. La estructura dimérica de 18-hidroxicorticosterona nunca pudo ser caracterizada por espectroscopía de masa. Otros dímeros de pregnanos 18-hidroxilados, 18-hidroxi, 11-deoxicorticosterona fueron informados, pero hasta el momento no se tiene conocimiento de dímeros de la familia de los esteroides 18-hidroxilados.

En este trabajo se han estudiado los productos formados durante la síntesis de 18-DAL a partir de 18-OHB por el método de Harnik, M. et al.(188). Este método se basa en la utilización de Cl_2CH_2 saturado con ácido p-toluensulfónico como medio de la reacción. El método original consiste en colocar al esteroide en cuestión en presencia de esta solución y calentar a 40°C (a reflujo) durante 20 minutos, para obtener de esta manera 18-DAL como producto final. Para poder observar los intermediarios de esta reacción se redujo la temperatura de trabajo hasta los 0°C. y las determinaciones se realizaron inmediatamente luego del agregado de los reactivos, en lugar de esperar los 20 minutos antes mencionados. Se realizaron cromatografías en papel, cromatografías en capa delgada, separaciones por HPLC y finalmente se determinó la relación masa/carga (m/z) de cada compuesto por espectroscopía de masa (FAB, fast atom bombardment). Usando esta metodología, se pudieron caracterizar tres moléculas, incluyendo, por primera vez, - un dímero que tenía un pico molecular protonado correspondiente a $[[2(18OHB) - 2(H_2O)] + H]^+$ Se podría suponer que la pérdida de las dos moléculas de agua conlleva a la formación del dímero unido por los carbonos C_{18} y C_{11}. Los otros dos picos corresponden a 18-OHB y a 18-DAL.

5.2 Reactivos

Tanto la [1,2-^{3}H] 18-hidroxicorticosterona como la [1,2-^{3}H]corticosterona fueron adquiridas en Amersham Corporation (Arlington Heights, IL USA). La 11,18-epoxicoticosterona (18-DAL) radioactiva y la radioinerte se obtuvieron en el laboratorio a partir de 18-OHB, por reacción con $Cl_2C_2H_2$ saturado con ácido p-toluensulfónico, según el método de Harnik antes mencionado (188). La 18-hidroxicorticosterona fue una donación del Dr. Marcel Harnik.

5.3 Reacciones

Se empleó una modificación del método de Harnik et al. (188) para la preparación tanto de 18-DAL como de los intermediarios lipofílicos. La técnica consiste en disolver aproximadamente 700µg de 18-OHB en Cl_2CH_2 saturado con ácido p-toluensulfónico y dejarlo por diferentes intervalos de tiempo. Luego de estar expuesto a estos tiempos cada muestra fue estudiada de manera tal de seguir la formación de los intermediarios de reacción y de los productos finales.

Como se estudió las características de 18-OHB en medio ácido, entonces se probó qué productos eran los obtenidos en un medio de características similares como ácido HCl 0.01N. Ante la imposibilidad de estudiar, en este caso, los compuestos por cromatografía en capa delgada, se utilizó cromatografía en papel, sistema Bush B5 descripto anteriormente en el párrafo 2.6.3.

5.4 Espectroscopía de masa

Los espectros de masa se llevaron a cabo en un equipo ZAB-SEQ espectrómetro de masa BEqQ (VG, Analitycal Manchester, UK). El voltaje de aceleración fue de 8kV (2µA). La fuente de presión utilizada fue de 4.10^{-7} mbar: El bombardeo de Cesio del FAB estuvo operada con un voltaje de 30kV con una corriente de emisión de 2µA. Los espectros fueron llevados a cabo en modo centroide "scaneando" la forma magnética desde 1000 a 200 u, a una velocidad de scaneo de 4s por década y una resolución de 1000 (definición de altura de pico del 5%). Se utilizó glicerol para la calibración del equipo. La concentración de la muestra en cada una de las matrices estudiadas en los resultados fue de 5µl de la solución de la muestra (concentración aproximada de 7 µg/µl).

5.5 Selección de la matriz más favorable

La matriz más favorable para el estudio de los compuestos esteroideos se eligió de acuerdo a un criterio de sensibilidad y resolución del equipo (por ejemplo se estudió cuál era la matriz para la cual la interferencia resultara mínima en la zona de trabajo). Se ensayó las diferentes matrices con un standard de 18-OHB, para ello se probaron: a) glicerol, b) alcohol o-nitrobencílico (NOBA), c) glicerol más NH_4OH (27% acuoso) (1:2). La última matriz fue la *elegida*, se vio que aumenta la sensibilidad del método incrementando considerablemente la producción de iones positivos (M más H^+). En contraste, NOBA genera una interferencia en la zona de 500-600mμ, zona de detección para el pico correspondiente al ion del dímero ($M+H^+$). Se muestran a continuación los espectros de 18-OHB en las diferentes matrices ensayadas (Figura 5.5, 5.6 y 5.7).

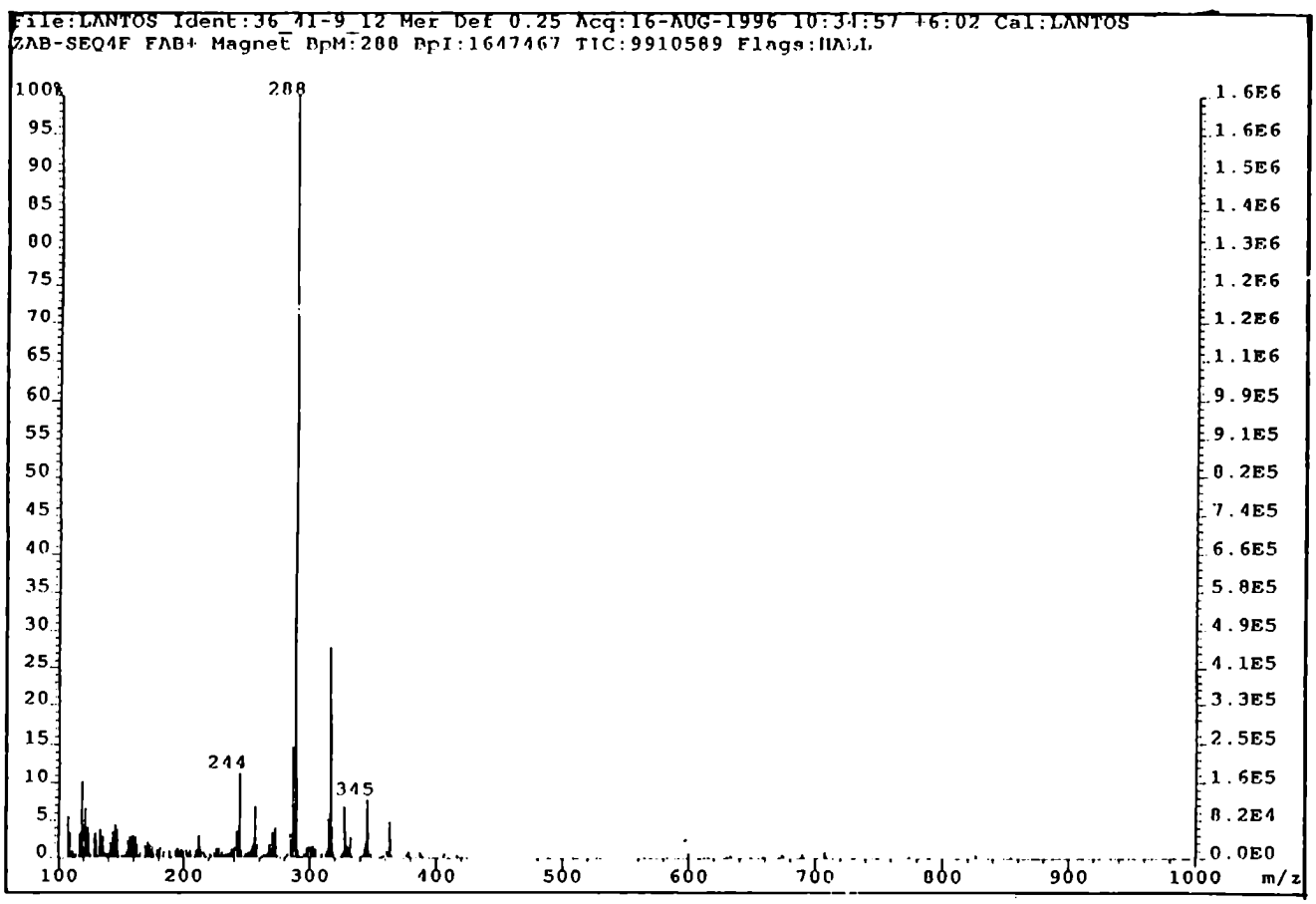


Figura 5.5: Espectro de 18-OHB, matriz glicerol.

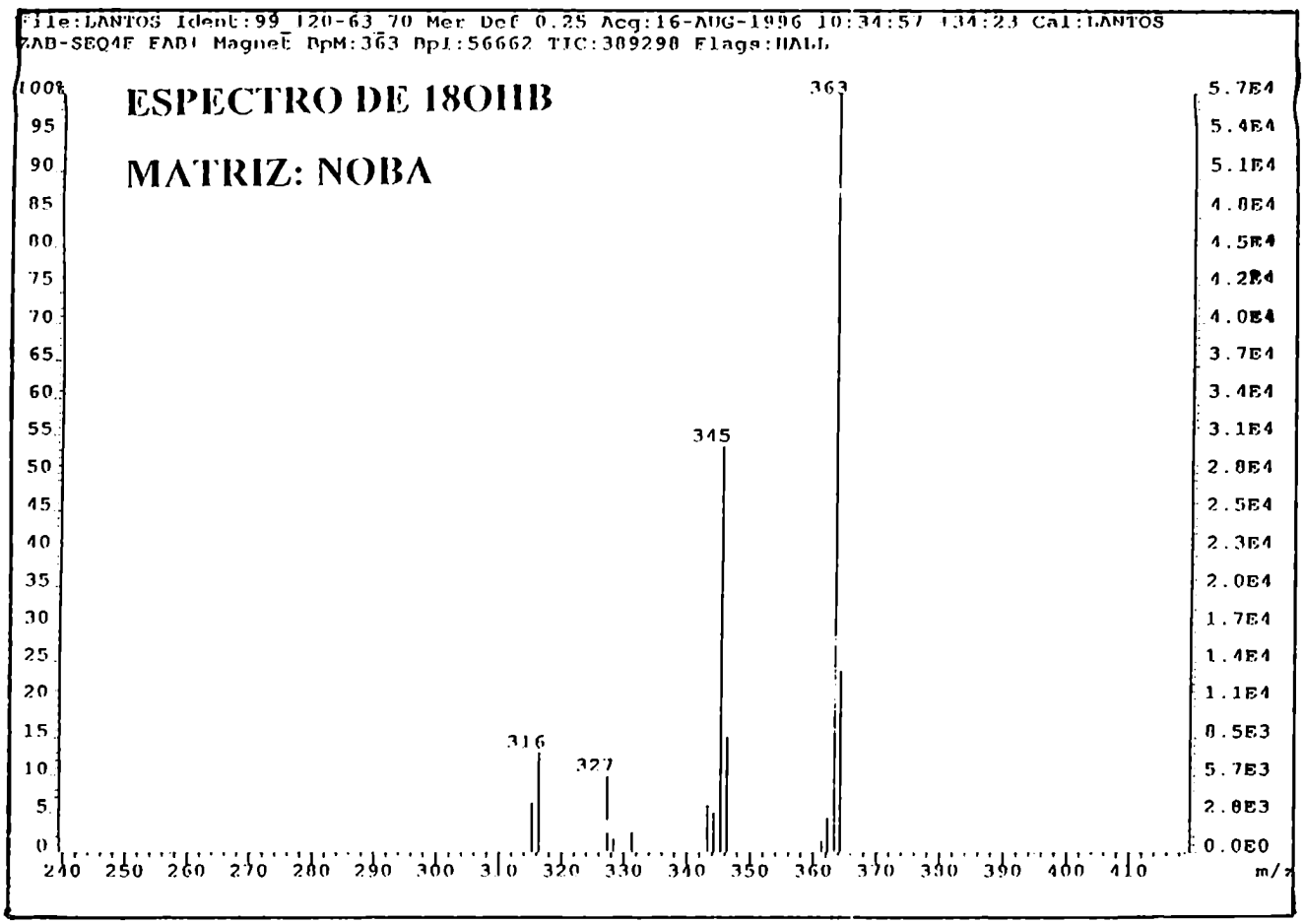


Figura 5.6: Espectro de 18-OHB, matriz NOBA.

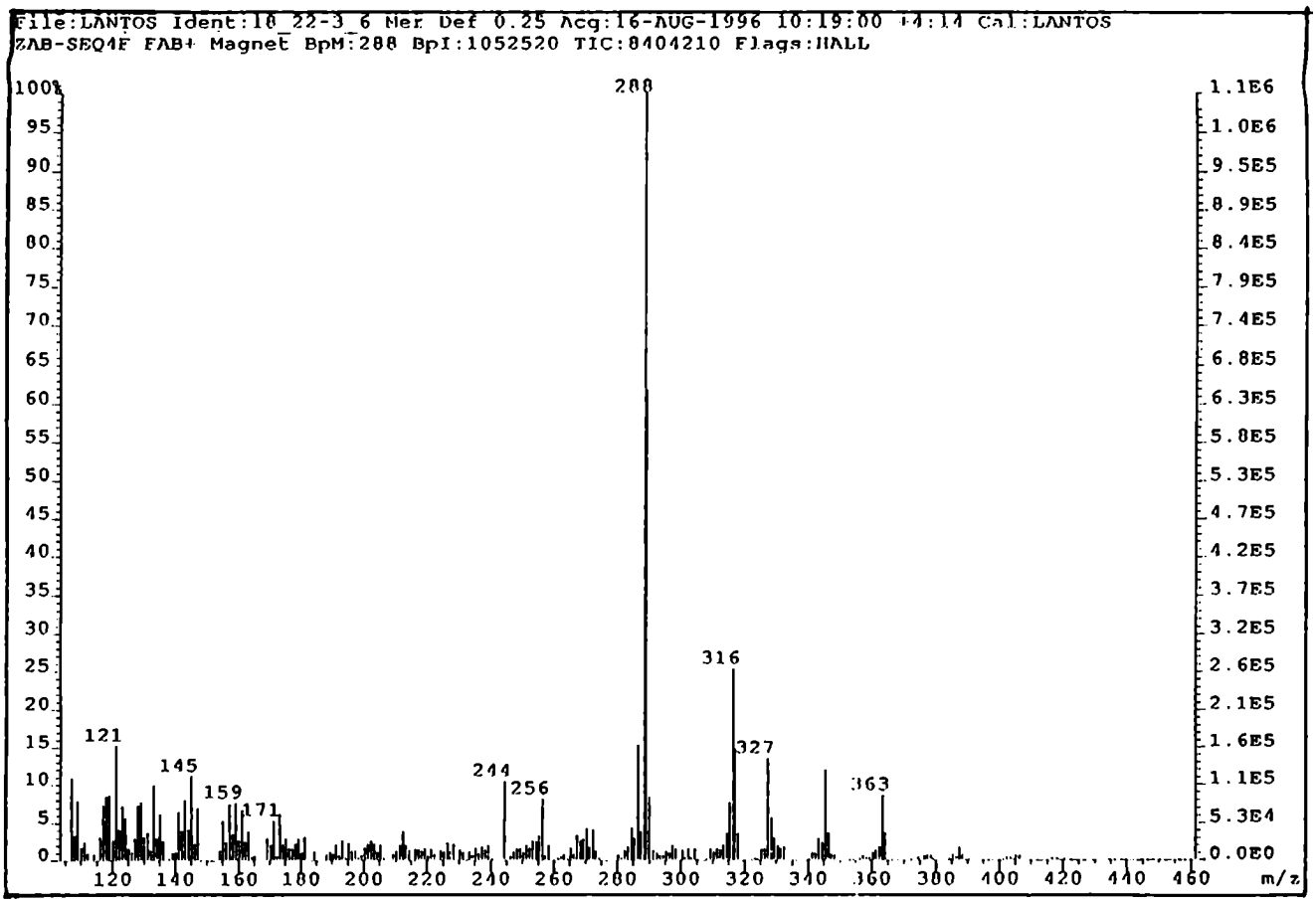


Figura 5.7: Espectro de 18-OHB, matriz glicerol + amoníaco.

El espectro obtenido por FAB para 18-OHB en glicerol : NH_4OH se muestra en la figura 5.7. Se observa el pico de $(M+H^+)$ a 363, la perdida de dos moléculas de agua da un pico a $(M+H^+)$ 327 y un pico de base con un valor de $(M+H^+)$ de 288 correspondiente a la pérdida de la cadena lateral más el 19-metilo.

5.6 Estudio de los compuestos obtenidos por FAB

La Tabla 5.1 muestra los valores de $(M+H^+)$ de los picos que se esperaría encontrar en esta espectroscopía de masas y que en este estudio coincidieron con los datos obtenidos por espectroscopía FAB.

ESTEROIDE	$[M+H^+]$	m/z
18-OHB	$C_{21}H_{30}O_5$	*363*
18-DAL	$C_{21}H_{28}O_4$	*345*
DIMERO*	$(C_{21}H_{28}O_4)$	*689*

Tabla 5.1: valores de $(M+H^+)$ para diferentes esteroides. *El dímero a que se hace referencia es el correspondiente a $[[2(18OHB) - 2(H_2O)] + H]^+$

La Tabla 5.2 muestra los principales picos formados a distintos intervalos de tiempo durante la conversión de 18-OHB a derivados de formas menos polares.

TIEMPO (min.)	PICOS MÁS IMPORTANTES
12	363, 437, 689
30	345, 437, 689
50	345, 363, 529, 689
60	363, 345, 529, 689
75	345, 405, 437, 689
90	288, 327, 345, 405, 437, 689

Tabla 5.2: Picos $M+H^+$ en la conversión de 18-OHB en medio ácido.

Como se puede observar además de los picos 363, 327 y 288, otro pico aparece a ($M+H^+$) 345 correspondiente a (18DAL$+H^+$) Espectros sucesivos también muestran la pérdida de agua (($M+H^+$) = 327) y la pérdida completa de la cadena lateral de este pico (($M+H^+$) = 288). También, desde los primeros tiempos se observa la presencia de un pico de ($M+H^+$) = 689, correspondiente a un dímero de dos moléculas de (18-DAL – 2(H_2O). La figura 5.8 representa las reacciones principales involucradas durante el tratamiento con ácido p-toluensulfónico. La figura 5.9 y 5.10 presentan la conversión en función del tiempo de 18-OHB a sus compuestos menos polares.

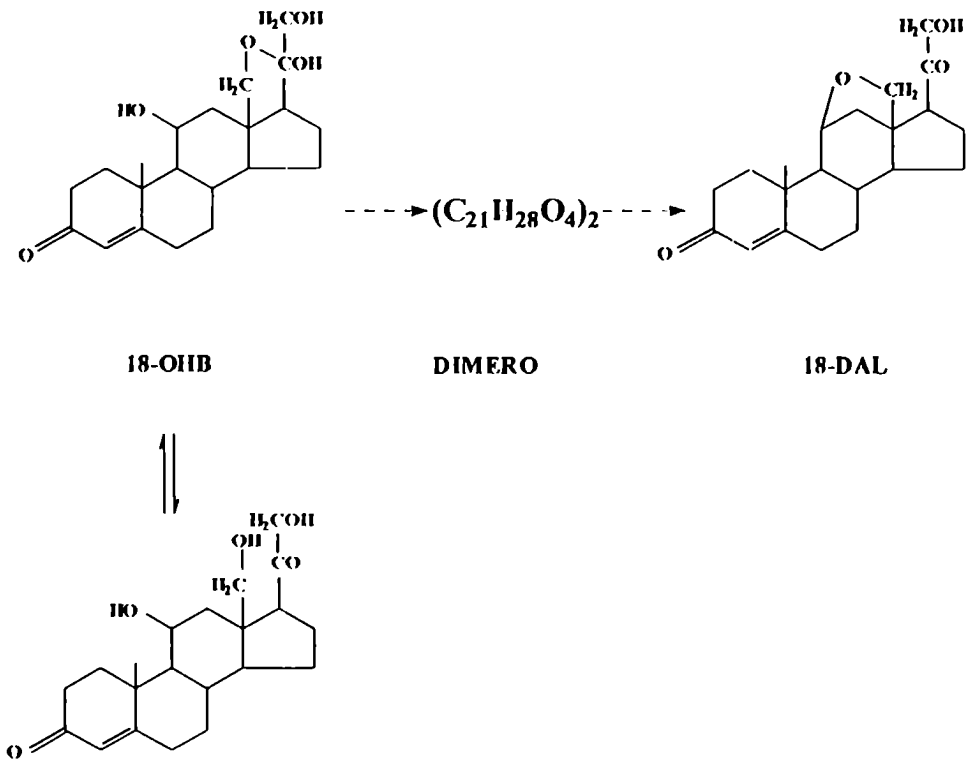


Figura 5.8: Secuencia de reacciones esperables durante el tratamiento con ácido p-toluensulfónico.

La Figura 5.9 expresa la abundancia en relación del pico base, mientras que la Figura 5.10 representa la abundancia de cada pico con respecto a la suma de los tres picos involucrados. Una peculiariedad es el paralelismo entre la evolución del pico ($M+H^+$) correspondiente al dímero y la de 18-OHB. Con pequeñas diferencias, ambos exhiben un máximo cercano a los 80 minutos, luego descendiendo abruptamente. 18-DAL, por otro lado, presenta un "plateau" a altos niveles desde pequeños intervalos de tiempo, comenzando de tiempo t=0.

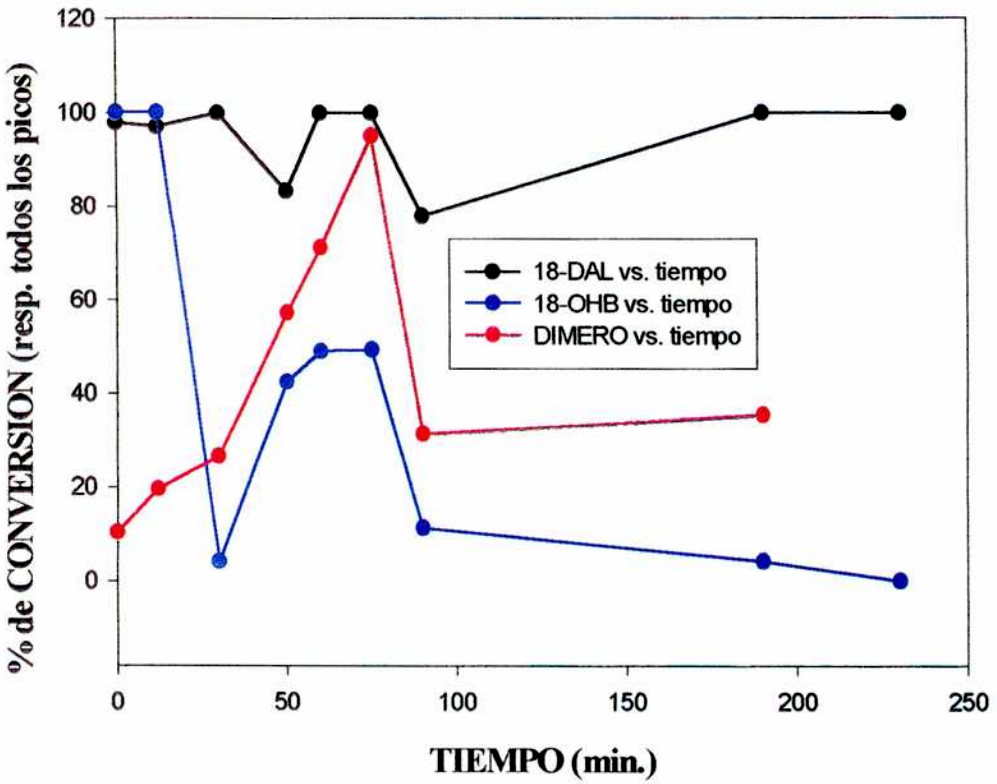


Figura 5.9: Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por espectroscopia de FAB, y graficada en función de la abundancia respecto del pico masa ($M+H^+$).

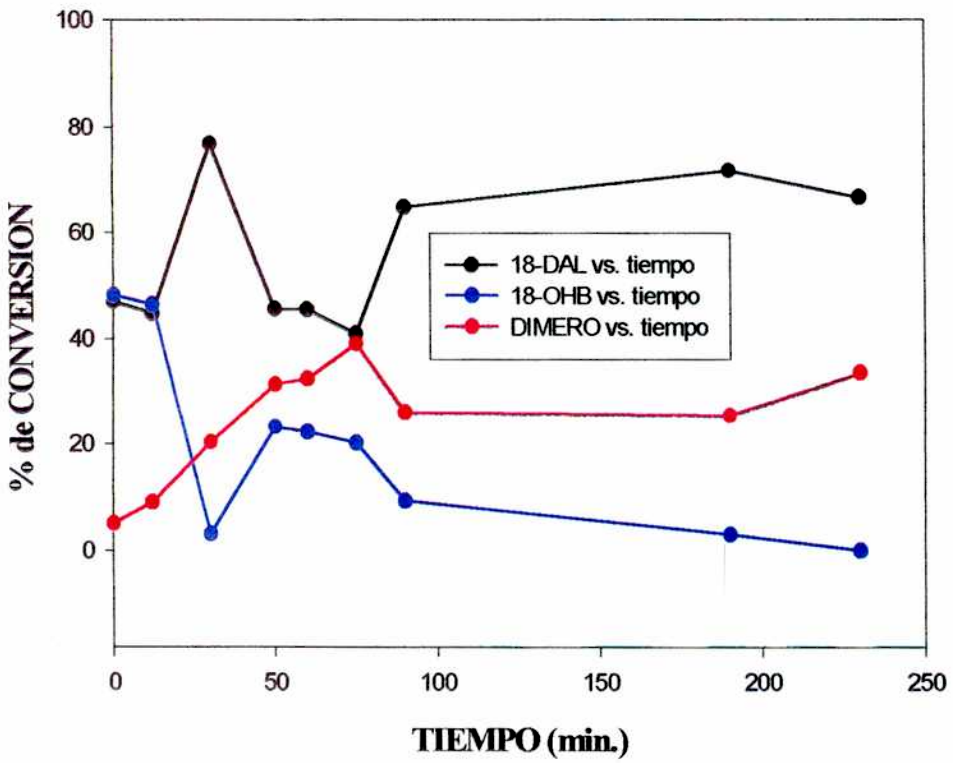


Figura 5.10: Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por espectroscopia de FAB, y graficada tomando como 100% de conversión a la suma del % de 18-OHB, 18-DAL y DIMERO.

Tanto la Figura 5.9 como la 5.10 parecerían mostrar la existencia de un equilibrio entre los compuestos involucrados a lo largo del tiempo.

5.7 Estudio de los compuestos por cromatografía en papel. Uso de HCl como medio de reacción.

Se estudió por cromatografía en papel tanto la reacción de 18-OHB a partir de su interacción con el ácido p-toluensulfónico como la interacción del mismo compuesto con ácido HCl 0.01N. Por cromatografía en sistema Bush B5 se obtuvieron los Rfs detallados en la Tabla 5.3.

ESTEROIDE	Rf
18-OHB	0.12 ± 0.01
ALDOSTERONA	0.42 ± 0.02
18-DAL*	0.85 ± 0.02

Tabla 5.3: Rf obtenidos por cromatografía en papel, sistema Bush B5. *El compuesto 18-DAL al que se hace referencia es el obtenido por el método de Harnik, et al.(188)

Cuando se trata 18-OHB con HCl 0.01N el producto de esta reacción, en cromatografía en papel en las mismas condiciones anteriores, da un Rf de 0.50 y no de 0.85 como el obtenido anteriormente. Este compuesto es al que históricamente se lo denominó 4.33; esta manera de nombrarlo se debe al resultado que se obtiene al realizar la relación entre el Rf del compuesto en cuestión y el Rf de 18-OHB. El uso comparativo de HCl fue necesario a los fines de comparar nuestros estudios con los realizados anteriormente en nuestro laboratorio con dicho ácido mineral.

Se estudió la estabilidad de dicho compuesto, se pudo ver que si a la mancha correspondiente al 4.33 se la eluye con Cl_2CH_2 y se la vuelve a sembrar y a correr en el mismo sistema Bush B5, se produce una reversión a 18-OHB del 11.7%. Pero, si a una parte de este eluído se le agrega Cl_2CH_2 saturado con ácido p-toluensulfónico y se lo vuelve a correr en el

El equilibrio recién demostrado se desplazaría hacia uno u otro esteroide dependiendo de las condiciones del medio.

Dentro de los parámetros de reacción principales que regularían la posición de equilibrio se establecieron en primera instancia:

i) Tiempo de reacción

ii) Temperatura

iii) Concentración de ácido p-toluensulfónico

Así, los experimentos siguientes, se concibieron y desarrollaron en dicho marco.

Se pensó entonces que si el compuesto 4.33 era intermediario entre 18-OHB y 18-DAL, era posible encontrar también a este intermediario en la reacción con ácido p-toluensulfónico. Esta reacción ocurre a una temperatura de 40°C durante un reflujo de 20 minutos. Lo primero que se estudió fue qué ocurría si se disminuía el tiempo al cual se mantenía a reflujo la mezcla (manteniendo la temperatura constante a 40°C) y se vio que tanto a 1, 3, 5, 10 y 20 minutos la conversión a 18-DAL era total, por lo tanto la conclusión fue que no sólo había que bajar el tiempo de trabajo sino que también se debería disminuir la temperatura. Trabajando con estas nuevas condiciones (temperatura 0°C y tiempos de reacción de 1 minuto) se obtuvieron tres picos, uno coincidente con el Rf de 18-OHB, otro coincidente con el Rf de 4.33 y por último uno de Rf igual a 0.85 el cual correspondería a 18-DAL. Por lo tanto hemos encontrado que bajo estas condiciones de la reacción aparecería el pico del intermediario (Compuesto 4.33).

Se estudió por último qué ocurriría si al reactivo se lo diluía con Cl_2CH_2; tal vez esto también diera origen a la aparición del intermediario. Los datos obtenidos se encuentran en la Tabla 5.4.

Ac. p-toluensulfónico (ss) en Cl_2CH_2 : Cl_2CH_2	18-OHB (Rf = 0.14)	4.33 (Rf = 0.42)
1 : 10	100%	
1 : 5	100%	
1 : 4	100%	
1 : 3	87%	13%
1 : 2	40%	17%

Tabla 5.4: Reacción de 18-OHB en medio ácido de p-toluensulfónico. Se midieron los productos inmediatamente, se trabajó a temperatura ambiente. En la dilución 1:2 el resto de la 18-OHB original se transformó en 18-DAL (43%).

Por último la Tabla 5.5 muestra los resultados obtenidos cuando se trata 18-OHB con ácido p-toluensulfónico en una dilución 1:2 exponiendo al sustrato a distintos tiempos y a temperatura ambiente.

TIEMPO DE TRATAMIENTO	18-OHB	4.33	18-DAL
0 min.	39%	17%	44%
5 min.	44%	30%	26%
15 min.	33%	12.5%	35%
30 min.	32%	17%	51%

Tabla 5.5: Tratamiento de 18-OHB en medio ácido diluído al medio a distintos tiempos de exposición y a temperatura ambiente.

Por lo que se puede apreciar en la Tabla 5.5 existiría un equilibrio entre las tres formas encontradas, esto reafirmaría los resultados obtenidos por espectroscopía FAB y mostrados en las Figuras 5.9 y 5.10.

5.8 Estudio de los compuestos por cromatografía en HPLC

Según el sistema descripto en el párrafo 2.6.5 se cromatografiaron los diferentes compuestos obtenidos según 5.7 dando los tiempos de retención detallados en la Tabla 5.6.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCION
18-OHB	5.56 ± 0.01
ALDOSTERONA	5.73 ± 0.01
CORTICOSTERONA	11.79 ± 0.03
18-DAL	7.68 ± 0.02
COMPUESTO 4.33	8.27 ± 0.02

Tabla 5.6: Tr de los diferentes compuestos cromatografiados por HPLC de fase reversa, con mezcla de corrida CH_3OH H_2O (3:2), a un flujo de 0.8ml/min., a una presión de 1700 psi.

Por otra parte, se trató de seguir la evolución a través del tiempo de la formación del dímero por HPLC, trabajando en medio ácido p-toluensulfónico, a temperatura ambiente (Figura 5.11). Las condiciones de corrida en HPLC fueron las descriptas en la sección 2.19.3). Debido a que la reacción transcurre en medio ácido se cambió el solvente de corrida por una mezcla ácida para ver si esto favorecía la proporción del dímero formado (Figura 5.12). La mezcla de corrida cromatográfica fue CH_3CH_2OH H_2O CH_3COOH en proporciones 60 : 40 0.04, las demás condiciones se mantuvieron iguales a la corrida anterior.

Nuevamente se observa un paralelismo entre la formación del dímero y la desaparición de 18-OHB, manteniéndose siempre mucho más alta la proporción de 18-DAL formada.

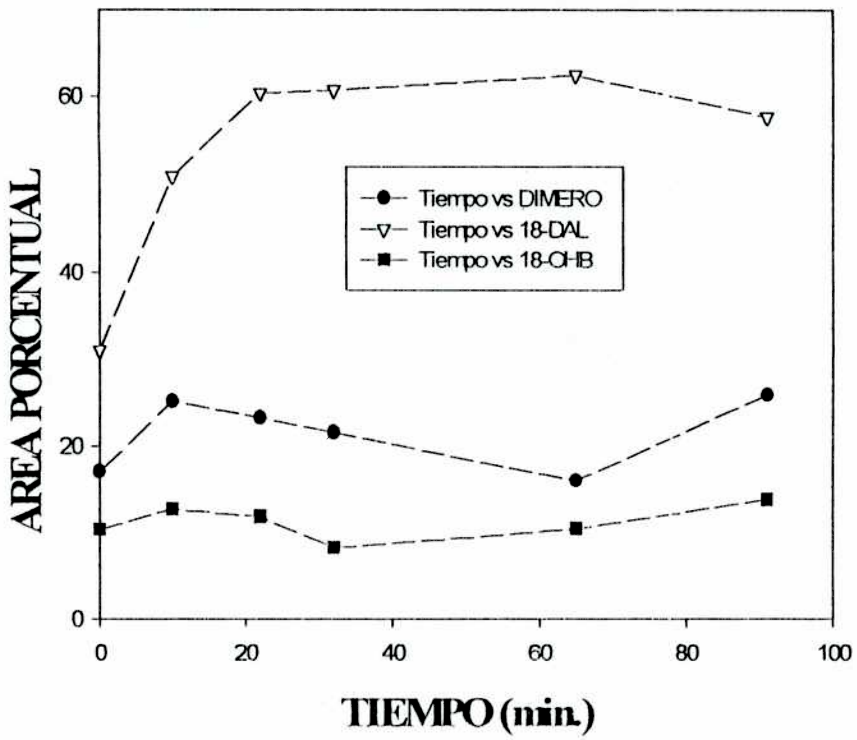


Figura 5.11: Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguida por HPLC, y graficada tomando como area porcentual el area calculadapor integración de todos los picos, según lo expuesto en la sección 2.19.3.

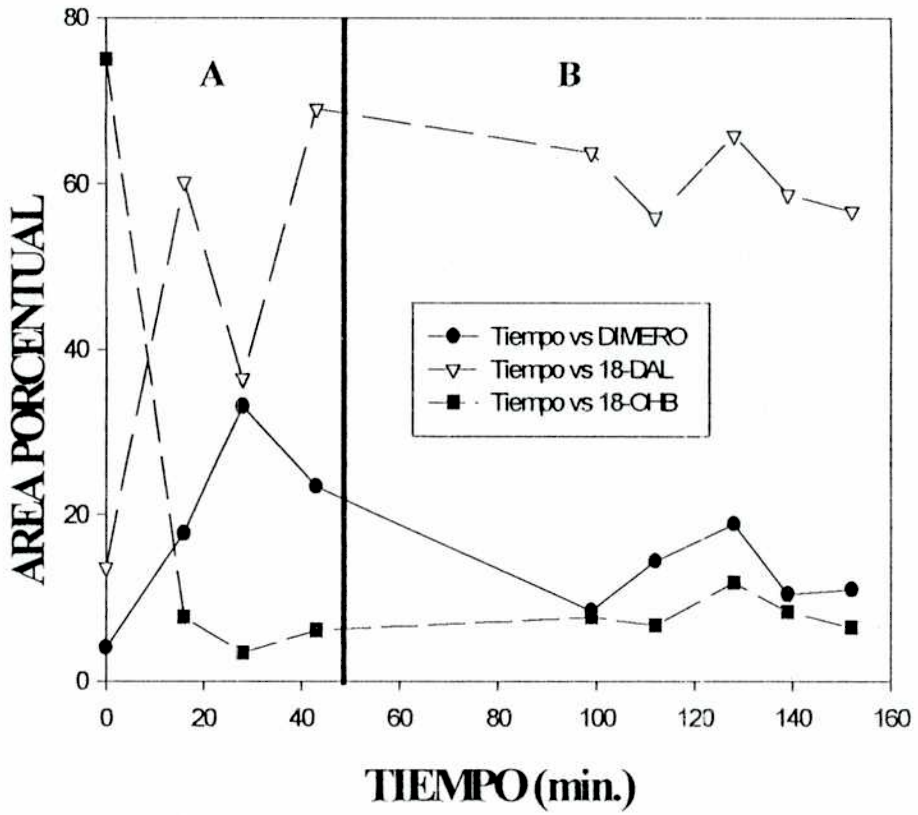


Figura 5.12: : Conversión de 18-OHB en 18-DAL seguidaHPLC, y graficada tomando como como area porcentual el area calculadapor integración de todos los picos, según lo expuesto en la sección 2.19.3.En la sección A la mezcla de solventes utilizada fue CH_3CH_2OH : H_2O : CH_3COOH en proporciones 60 : 40 : 0.04, mientras que en la sección B la mezcla fue CH_3CH_2OH : H_2O (60 : 40).

5.9 Comparación de los métodos utilizados.

El compuesto 4.33 obtenido por reacción de 18-OHB en medio ácido HCl 0.01N, cromatografiado en papel con el sistema Bush B5, se eluyó del papel con Cl_2CH_2 y se cromatografió en fase reversa por HPLC. El resultado fue la obtención de un pico que eluyó a un t_R de 8.27 minutos. Una alícuota del mismo eluído se estudió por cromatografía FAB y se observó un pico ($M+H^+$) de 689 correspondiente a un dímero de 18-OHB (Figura 5.13).

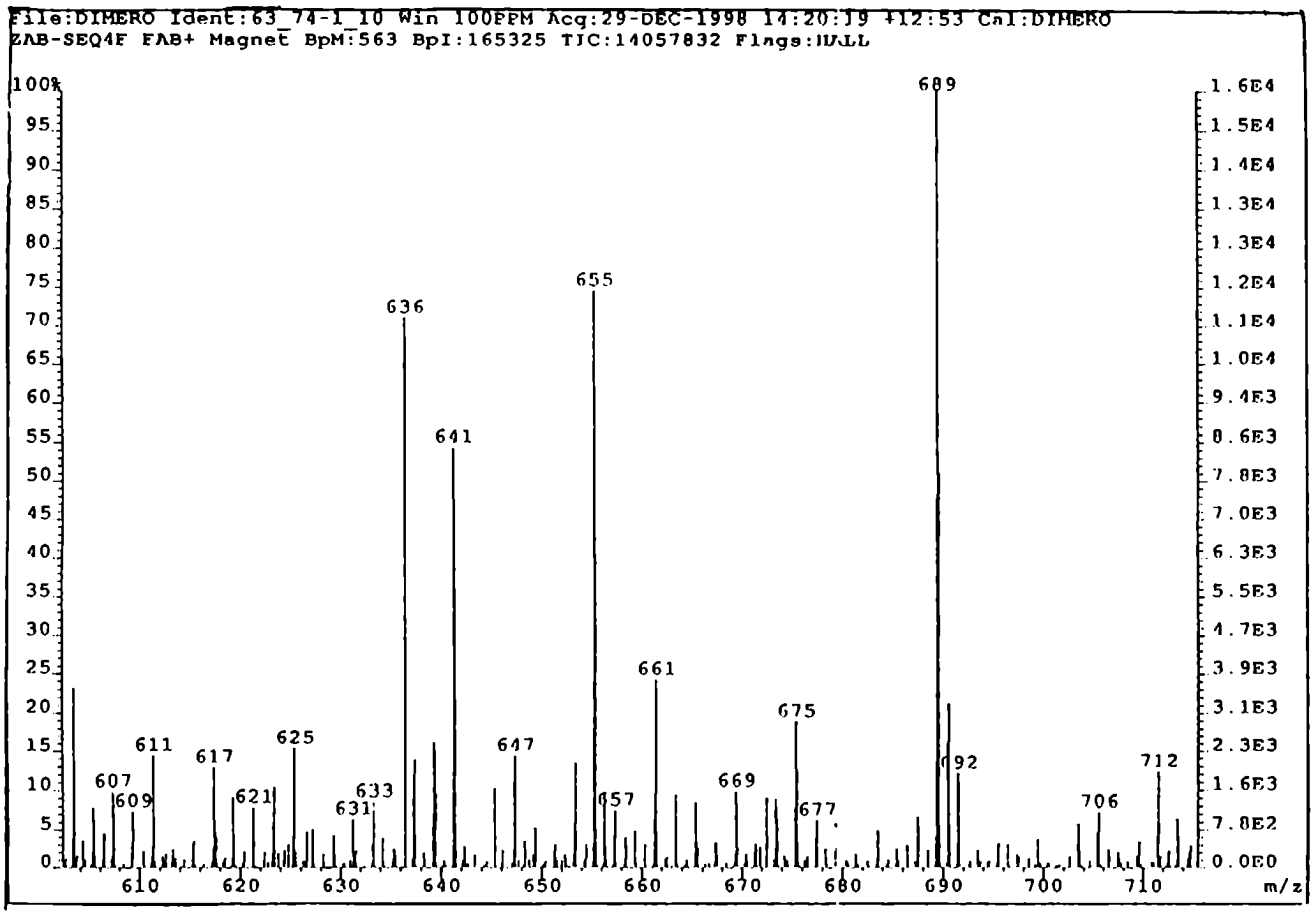


Figura 5.13: Espectro de MS_FAB del compuesto que corre con un Rm 4.33 en cromatografía de papel, eluído con Cl_2CH_2 y que corrido en HPLC (bajo las condiciones especificadas en el párrafo 2.19.3) posee un tr de 8.27 min.

5.10 Dímero de 18-OHB como sustrato en el camino de biosíntesis de aldosterona.

Una vez aislado y caracterizado el dímero de 18-OHB, se estudió su grado de precursoriedad para la formación de aldosterona usando como fuente de enzima mitocondrias de glándula adrenal de rata. Se lo comparó con precursores ya conocidos, como corticosterona, 18 *hidroxi*corticosterona y 18-desoxicorticosterona. Las incubaciones se realizaron con concentraciones constantes de todos los sustratos utilizados. Para la cuantificación de los esteroides en solución se utilizó en método descripto en el párrafo 2.6.

5.10.1 Incubaciones

Se utilizaron ratas machos CHBBThom que pesaban 200-250 grs las cuales fueron aportadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron las glándulas suprarrenales colocándolas en solución salina de KCl 0,9%. Se les retiró el tejido graso y conectivo que las rodea y se extrajo la cápsula para su posterior tratamiento. Todos estos pasos fueron realizados a una temperatura de 4°C. Se procedió entonces a su homogeinización en Buffer Krebs Ringer bicarbonato-glucosa. El pH de trabajo fue de 7.4

Una vez realizado el homogenato se realizó un fraccionamiento subcelular de forma de trabajar con la fracción correspondiente a las mitocondria de las glándulas suprarrenales. Para las incubaciones se utilizó el mismo buffer pero con un agregado de propilenglicol (no más del 20%), de manera de ayudar a la solubilización de los esteroides que se usaron como sustrato. La reacción fue iniciada por agregado de 0.5mM de NADPH como cofactor y las incubaciones fueron llevadas a cabo a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en un baño de hielo-agua y posterior centrifugación. En los sobrenadantes se midió la cantidad de aldosterona biosintetizada. (Ver Sección 2.4).

5.10.2 Resultados

La Figura 5.14 muestra los resultados obtenidos en las diferentes incubaciones. Se

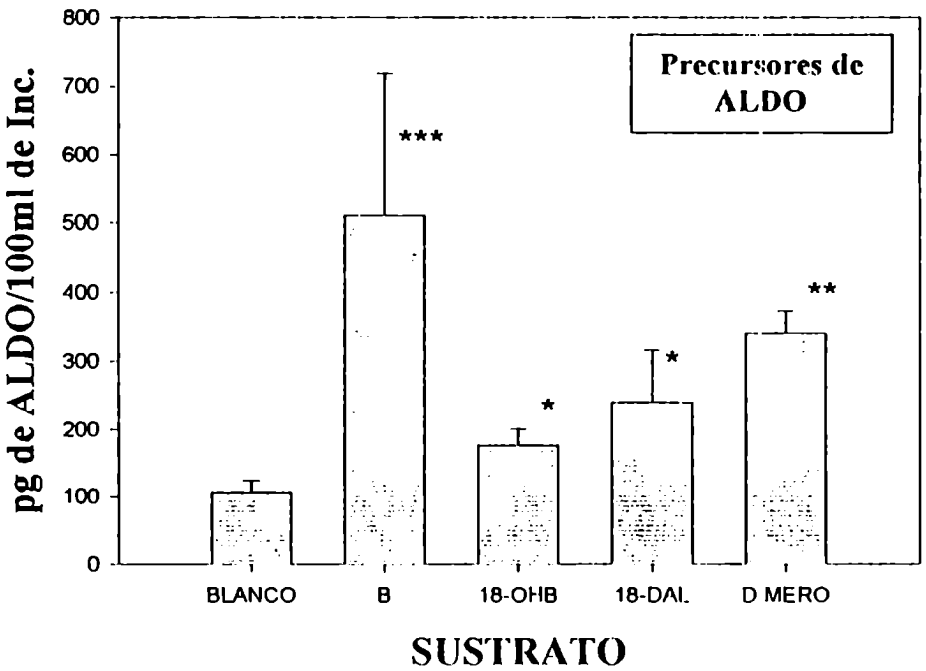


Figura 5.14: Incubación de diferentes precursores de aldosterona. Todos los precursores se encuentran en una concentración 1μM, tiempo de incubación 40 minutos, temperatura de trabajo 37°C. * no significativo; **p< 0.01 y *** p< 0.001 todos respecto del control

puede ver que, como era de esperar, corticosterona es el mejor sustrato para la formación de aldosterona; mientras que el dímero se comporta mejor que 18-OHB y 18-DAL.

5.10.3 Conclusiones

En este trabajo se ha investigado las moléculas formadas a partir del tratamiento de 18-OHB con ácido p-toluensulfónico

Bajo las condiciones estudiadas en medio ácido p-toluensulfónico, tres compuestos en aparente equilibrio (18-OHB, compuesto 4.33 y 18-DAL) pudieron ser aislados, incluyendo por primera vez un dímero de 18-DAL. Estas moléculas fueron caracterizadas tanto por espectroscopía de masa-fast atom bombardment (MS-FAB) (Tabla 5.1), como por HPLC (Tabla 5.6), obteniéndose tres compuestos diferentes, uno de pico molecular correspondiente a [2(18-OHB)-2(H_2O)] + H^+ -dímero de 18-DAL-. Los otros dos picos coinciden con 18-OHB y 18-DAL, con tiempos de retención -por HPLC- totalmente definidos para los tres compuestos. Partiendo de molaridades precursoras idénticas los moles de aldosterona formados a partir del dímero duplican a aquellos formados a partir de 18-OHB. Por otra parte, de acuerdo con lo visto anteriormente, 18-DAL resultó mejor precursor para ALDO que 18-OHB, lo cual coincide con trabajos anteriores de Cozza et al. (82).

Efectos del Litio

Capítulo 6 Efectos del Litio sobre la esteroidogénesis de adrenal de rata y vizcacha.

6.1 Introducción

El litio junto con el sodio, potasio, rubidio y cesio pertenecen al grupo IA de los llamados metales alcalinotérreos de la clasificación periódica de los elementos. La estructura del litio es similar a la del sodio y potasio compartiendo características físicas similares. En cuanto a sus radios atómicos el litio es el que posee el radio más pequeño (0.60 Å), siguiéndolo el sodio (0.95 Å) y el potasio (1.33 Å) dando esto origen a efectividades relativas en diversos procesos celulares. Por ejemplo, a diferencia del sodio y el potasio, el ión litio puede atravesar las membranas biológicas.

Es muy conocida en estos tiempos la importancia de las sales de litio como agentes terapéuticos, su uso se aplica en casos de manía aguda y es utilizado también como agente profiláctico en la psicosis maníacodepresiva recurrente.

El ión litio, de todas formas, tiene uno de los rangos de dosis más estrechos de las drogas más comúnmente usadas como psicofármacos. Es importante entonces evaluar sus propiedades y conocer si existen efectos colaterales y reacciones tóxicas que tengan lugar durante la terapia. De todas formas, tanto los estudio básicos como los clínicos que han tenido lugar durante los últimos años han demostrado que el tratamiento por tiempos largos puede estar asociado con un rango amplio de funciones endócrinas anómalas y toxicidades metabólicas adversas. Por ejemplo se ha informado que el tratamiento largo con el ión litio en humanos, produce un hipofuncionamiento de la glándula tiroidea y bocio, hipercalcemia e hiperparatiroidismo, inhibición de la liberación de gastrina, junto con efectos gastrointestinales, cardiovasculares, hematológicos y alteración del metabolismo de glucosa (184-188). Jacobb, J.J. et al. (189) demostraron la influencia del tratamiento crónico con cloruro de litio sobre la función adrenal en la rata macho. En estos experimentos se observó un elevado nivel de la concentración de corticosterona en plasma. En estudios previos (184;190) llevados a cabo en vizcacha se había demostrado que el tratamiento crónico con el ión litio produce también alteraciones histológicas sobre la corteza de la glándula adrenal y sobre otros tejidos del animal en estudio. En la rata, el daño era menor. La vizcacha

(Lagostomus maximus maximus) es un roedor típico de las pampas argentinas, predominantemente nocturno, el cual no se expone a largos fotoperíodos (191).

Se ha observado recientemente, en un estudio histológico, después de un tratamiento de 30 días con LiCl (1meq/kg) que el daño producido por el ión litio, desaparece totalmente en la glándula pituitaria, parcialmente en los testículos, permanece en el riñón y se incrementa en la glándula adrenal de vizcacha.

Existen pocos trabajos que traten el tema del efecto del litio sobre la glándula adrenal. En este trabajo se ha estudiado, en una primera aproximación al problema y como etapa inicial de estudios posteriores, la influencia del tratamiento crónico con cloruro de litio sobre el funcionamiento de la corteza adrenal de vizcacha y rata.

6.2 Materiales y Métodos

6.2.1 Animales tratados

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron 12 vizcachas machos (Lagostomus maximus maximus) que pesaban 4.5 – 5.5 kg. Los animales fueron capturados (durante el mes de febrero de 1996) en su hábitat natural cerca de los alrededores de la ciudad de San Luis, Argentina y se mantuvieron en cautiverio durante dos meses en jaulas aisladas, manteniendo la temperatura a (20 ± 2)°C, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad con libre acceso de agua y comida. Los animales se distribuyeron en dos grandes grupos, Grupo I (Grupo tratado): animales a los cuales se les suministró una dosis diaria de LiCl, (1meq/kg) en el lapso de 30 días y un segundo grupo Grupo II (grupo control): animales a los cuales se les inyectó agua esterilizada y destilada.

Por otro lado se utilizaron también 12 ratas machos Wistar de peso entre 150-200 grs. Los protocolos de tratamiento fueron similares a los utilizados para las vizcachas.

6.2.2 Materiales

La aldosterona tritiada y corticosterona tritiada se obtuvieron a través de New England Nuclear, Boston, MA, USA. Los esteroides sin marcación y la seroalbumina bovina (BSA)

fueron obtenidas de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Las columnas de extracción utilizadas fueron SPE Backerbond spe octadecil (C18) (las cuales trabajan con 3ml de volumen y 500 mg en peso seco del adsorbente) y fueron adquiridas a J.T.Backer, Phillipsburg, NJ, USA. Todo el resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

6.2.3 Extracción de los esteroides de plasma

Los esteroides plasmáticos se extrajeron usando una columna de extracción de fase sólida C_{18}. Las columnitas fueron prelavadas dos veces con 3ml de CH_3OH y equilibradas con 6ml de agua. Los estudios se realizaron sobre 1ml de plasma, el cual fue colocado en las columnas y posteriormente se lavó con una mezcla H_2O : CH_3CN (80:20). Los esteroides fueron eluídos con 0.5ml de metanol, 3 veces. Se juntaron los tres extractos de metanol y se los llevó a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El sistema se reconstruyó con 100 ml de buffer borato 0.1M, pH = 8.0, para luego cuantificarlos por radioinmunoensayo.

Para poder calcular las pérdidas ocasionadas por el método separativo, a muestras de plasma se les agregó 100.000dpm de ^{3}H-aldosterona ó ^{3}H-corticosterona y se las procesó en forma paralela con las muestras en estudio. La radioactividad asociada a las muestras se midió en un contador de centelleo líquido. Los porcentajes de recuperación fueron de 55-80% para corticosterona y 74-90% para aldosterona.

Para el estudio enzimático se pesaron y homogeneizaron las glándulas adrenales, en un buffer de homogeinización (ver más adelante). Se utilizaron los homogenatos como fuente enzimática para los estudios de biosíntesis de DOC a ALDO y de DOC a B. Los productos obtenidos de estas transformaciones fueron cuantificados por RIA.

6.2.4 Radioinmunoensayos

Tanto aldosterona como corticosterona fueron cuantificadas en las muestras plasmáticas y en los sobrenadantes de incubación por radioinmunoensayo (RIA) como se ha descripto en la sección 2.7. Para ello se utilizaron anticuerpos específicos como fue descripto en trabajos previos (137;138).

6.2.5 Incubaciones

Las glándulas adrenales fueron homogeneizadas en un buffer de homogeinización Krebs Ringer bicarbonato pH=7.4, más el agregado glucosa en concentración 1.0 g/l. Se incubaron alícuotas de homogenato conteniendo entre 30-300 mg de proteínas. El ensayo se realizó por duplicado a 37°C durante 20 minutos en buffer de homogeinización conteniendo 0.5mM de $NADPH^+$ y 30mM de 11-deoxicorticosterona (DOC).

La incubación fue iniciada por el agregado de $NADPH^+$ y se prolongó 45 minutos. Luego, se colocaron los tubos de incubación en un baño de hielo-agua y posteriormente se los centrifugó a 10,000 g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se cuantificaron los esteroides presentes en el sobrenadante.

Se midió la conversión de 11-desoxicorticosterona a corticosterona (DOC → B) y 11-desoxicorticosterona a aldosterona (DOC → ALDO) según lo descripto anteriormente (137;138). Brevemente, aldosterona se pudo medir directamente en el sobrenadante mientras que para la medición de corticosterona se tuvo que extraer DOC presente, pues tiene alta reacción cruzada con el anticuerpo anticorticosterona. Para ello se realizaron dos extracciones con dos volúmenes de hexano (descartando la fracción orgánica) de manera tal de eliminar DOC presente en el líquido sobrenadante de la centrifugación (Ver item 4.7 Determinación de esteroides).

Se midió la concentración de proteínas por el método de Braadford (140) usando como standard para la curva de calibación sueroalbúmnia bovina (BSA).

6.3 Resultados

6.3.6 Niveles de esteroides en suero

Las ratas y vizcachas tratadas con Li^+ no presentan una disminución significativa en los niveles de corticosterona en plasma; los datos obtenidos se pueden observar en la Tabla 6.1.

ESPECIE	CORTICOSTERONA EN PLASMA (ng/ml)	
	CONTROL	TRATADO
RATA	372 ± 37	266 ± 26*
VIZCACHA	11.59 ± 0.60	9.84 ± 0.65**

Tabla 6.1: Concentraciones plasmáticas de corticosterona.

*tratados vs. control, n = 3, p = 0.082.

**Tratados vs. control, n = 6, p = 0.075.

Los efectos producidos por el tratamiento con LiCl sobre los niveles de aldosterona plasmática se muestran en la Tabla 6.2. Se observa que el efecto del catión Li^+ sobre la rata produce un descenso del 77% mientras que en vizcacha el fenómeno es inverso produciendo un aumento del 416%.

ESPECIE	ALDOSTERONA EN PLASMA (pg/ml)	
	CONTROL	TRATADO
RATA	508 ± 95	118 ± 28*
VIZCACHA	31 ± 4	129 ± 24**

Tabla 6.2: Concentraciones plasmáticas de aldosterona.

* Tratado vs. control, n = 3, p = 0.066.

**Tratados vs. control, n = 2, p = 0.056.

6.3.7 Actividad enzimática.

Cuando los homogenatos adrenales fueron incubados con 11-desoxicorticosterona 30 μM durante 20 minutos y luego se midió aldosterona y corticosterona en los sobrenadantes de la centrifugación, la conversión de 11-desoxicorticosterona a corticosterona en la glándula adrenal de rata sólo disminuyó un poco en los animales bajo el efecto del ión Li^+ (ver Tabla 6.3). También se puede observar que la conversión de 11-desoxicorticosterona a corticosterona aumentó un 50% en el caso de las vizcachas tratadas con el ión litio.

ESPECIE	pg CORTICOSTERONA/ mg DE PROTEÍNA.MIN	
	CONTROL	TRATADOS
RATA	15.2 ± 0.5	13.4 ± 0.8*
VIZCACHA	10.4 ± 0.5	15.9 ± 0.6**

Tabla 6.3: conversión de 11-desoxicorticosterona a corticosterona (DOC → B).

* Tratado vs. control, n = 8, p = 0.096.

**Tratados vs. control, n = 5, p = 0.0001.

La conversión de 11-desoxicorticosterona a aldosterona (DOC → ALDO) no se vio afectada por el tratamiento con el ión litio en rata (Tabla 6.4). Por el contrario, en vizcachas esta conversión aumentó bajo el tratamiento con ión litio (Tabla 6.4).

ESPECIE	pg ALDOSTERONA/ mg DE PROTEÍNA.MIN	
	CONTROL	TRATADOS
RATA	0.202 ± 0.064	0.1738 ± 0.028*
VIZCACHA	30.86 ± 3.1	57.82 ± 2.72**

Tabla 6.4: conversión de 11-desoxicorticosterona a aldosterona (DOC → ALDO).

* Tratado vs. control, n = 8, p = 0.68.

**Tratados vs. control, n = 6, p = 0.0001.

6.4 Discusión

Existen en la actualidad pocos estudios que describan los efectos del ión litio sobre las hormonas secretadas por la glándula adrenal. En los humanos, los trabajos hallados son polémicos. Estas discrepancias pueden deberse a que las dosis usadas en los distintos trabajos no son las mismas y/o en la duración del tratamiento aplicado y/o el horario en que las muestras fueron tomadas.

Los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas macho alcanzan un mínimo entre las 8hs y las 10hs am y se incrementan gradualmente durante el dia, alcanzando un máximo a las 4hs. pm. Jacob et al. (1978)(192) demostraron que luego de dos semanas de tratamiento con LiCl (3meq/kg, v.a.) aparece un aumento significativo de la corticosterona presente en el suero a las 8hs. am el cual no se modifica en el caso de utilizar anestesia con éter.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que luego de 30 días de tratamiento con LiCl (1meq/kg, ip) no se vio afectada la conversión de DOC a B ni la de DOC a ALDO en ratas machos; mientras que los niveles en suero de corticosterona permanecen constantes tanto para rata como para vizcacha. La diferencia entre los trabajos realizados por Jacob y su grupo pueden deberse a que estos autores han utilizados dosis mucho más altas que las de este trabajo, como así también diferente duración del tratamiento.

En trabajos previos con vizcachas macho bajo tratamiento crónico con LiCl (3meq/kg x día) se observó que los animales fallecían a los pocos días de comenzado el tratamiento. Estudios histológicos realizados sobre la corteza adrenal de vizcachas sometidas a largos tratamientos con LiCl, mostraron alteraciones características principalmente en la zona glomerulosa de la glándula adrenal (190).

Jacob et al. concluyen que el sitio de acción del LiCl durante el tratamiento es el sistema nervioso central y no la glándula adrenal, hipotetizando que la producción por el tratamiento con Li+ proviene de un stress general el cual por momentos incrementa los niveles de corticosterona.

Estos resultados sugieren que el incremento en la biosíntesis de aldosterona y la variación de los niveles séricos de aldosterona para rata y vizcacha puede deberse, en parte, a la acción directa del ión Li^+ sobre la glándula adrenal.

En nuestros experimentos la actividad enzimática de producción de corticosterona sólo aumentó en vizcacha luego del tratamiento con LiCl; mientras que la de producción de aldosterona aumentó sólo en la misma especie bajo las mismas condiciones.

Que los efectos del ión litio sean diferentes para corticosterona y aldosterona (evidenciado en suero) debe explicarse por el diferente origen de ambos esteroides como *hormonas*. En efecto mientras que corticosterona es secretada por la zona fasciculata, la aldosterona lo es por la zona glomerulosa.

Por otro lado la diferencia entre los resultados de los experimentos para determinar niveles séricos y actividad enzimática, para el caso de la vizcacha, podrían ser debido a la actividad de la enzima 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11-HSD). En efecto, si la síntesis de corticosterona está aumentada (Tabla 6.3), la 11-HSD adrenal, que transforma corticosterona en 11-dehidrocorticosterona, la disminuiría, dando niveles séricos sin cambios (Tabla 6.1). Así, el LiCl aumentaría la actividad de 11-HSD en zona fasciculata. Para el caso de aldosterona, siempre en vizcacha, los resultados en la determinación de los niveles séricos y de la actividad enzimática coinciden. Esta situación está de acuerdo con el hecho que la enzima 11-HSD se localiza en zona fasciculata por lo cual, afectaría los niveles de corticosterona pero no los de aldosterona (Recordar que corticosterona en zona glomerulosa sólo tendría función de intermediario; ver Introducción, sección 1.2.2).

En rata, la situación es diferente e inversa. La variación en los niveles séricos y en la actividad enzimática, ambas para corticosterona, no es afectada por LiCl (Tablas 6.1 y 6.3), por lo que bajo la hipótesis mencionada más arriba, en esta especie la actividad de 11-HSD no sería afectada por LiCl.

Por otro lado, siempre en rata, para aldosterona, el LiCl no produce variaciones ni en los niveles séricos ni en su producción enzimática.

Estos resultados muestran: 1) la diferencia de comportamiento frente al tratamiento con LiCl entre la rata y la vizcacha; 2) el efecto del ión litio sobre algunos parámetros esteroidogénicos adrenales.

Conclusiones

Capítulo 7 Conclusiones

Habiendo realizados las discusiones de cada tema al final de cada capítulo, se realizara aquí un breve resumen de las conclusiones a las que se llegaron a lo largo de esta tesis.

El trabajo hasta aquí presentado estuvo orientado a dilucidar aspectos fundamentales relacionados con el estudio de los últimos pasos de la biosíntesis de aldosterona, más específicamente, aquellos relacionados con la cinética, el metabolismo y las estructuras de esteroides intervinientes. Mediante la utilización de distintos inhibidores del paso tardío se trató de hallar mediante métodos enzimáticos una respuesta al interrogante de cuántas enzimas participan en estas transformaciones. Con este fin se diseñaron y aplicaron distintas estrategias tales como, sustratos alternativos que pudiesen actuar como inhibidores competitivos, sustratos suicidas y tratamiento con litio

Por otro lado se realizó un estudio químico estructural sobre la transformación 18-OHB en 18-DAL, y se trató de comprobar si un compuesto de alto peso molecular (intermediario de esta transformación) podía ser a su vez un intermediario en este camino biosintético. Con este fin, se aplicaron técnicas de análisis estructural como EM-FAB

De acuerdo con los resultados de los experimentos se concluye:

- En los primeros experimentos diseñados para encontrar las condiciones para las mediciones de actividad enzimática se pudo apreciar que la presencia de los iones Ca^{++} o Mg^{++} estimula la producción de aldosterona, a partir de 11-desoxicorticosterona y a partir de corticosterona. La presencia simultánea de ambos, por otro lado, causa un efecto sinergístico a partir de 11-desoxicorticosterona. Se vio así también que el reemplazo de iones Ca^{++} por otro ión divalente no mejora las condiciones de incubación.

- El cortisol (sustrato alternativo en el camino biosintético de aldosterona) se comporta como un inhibidor competitivo en el metabolismo de DOC a ALDO, B a ALDO y 18-OHDOC a ALDO; no inhibiendo el camino de DOC a B, ni el de DOC a 18OHDOC. Tampoco se afectaría la relación B/18-OHDOC en el camino a partir de DOC. De esta manera se podrían caracterizar a las diferentes enzimas como sensibles a cortisol y no sensibles a cortisol. A su vez estos

resultados darían las bases para compararlos tanto en las características como en número con las enzimas obtenidas por biología molecular (CYP11B1 y CYP11B2, ver Introducción).

- El compuesto 18-EtDOC se comportó como sustrato suicida en el camino de DOC a ALDO. Se desarrolló un modelo matemático simple para el estudio de estos inhibidores, el cual permite el cálculo de las constantes cinéticas de inhibición. Se aplicó este modelo matemático en la inhibición por 18-EtDOC. Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 4.6. La dependencia de la constante el sustrato estaría sugiriendo que en el metabolismo de DOC a ALDO estarían participando al menos dos enzimas, las que catalizarían las reacciones ya descriptas por el modelo anterior (CYP11B1 y CYP11B2). La especificidad de la acción de 18-EtDOC sobre CYP11B2 resulta de significativa importancia como potencial fármaco para los distintos casos de aldosteronismo (Ver Introducción)

- Por otro lado se han estudiado los productos formados en el camino de 18-OHB a ALDO. De estos estudios, se pudo aislar e identificar un compuesto, inicialmente descripto como Rm 4.33, el cual resultó ser un dímero de 18-OHB. Se hallaron las condiciones óptimas para poder estabilizar y caracterizar a este compuesto, y una vez caracterizado se probó su bondad como sustrato en el camino mencionado. Según los datos obtenidos se observó que si se partía de cantidades equimoleculares de diferentes sustratos ya conocidos como así también de este nuevo compuesto aislado, éste resultaba mejor precursor ya que los moles de aldosterona obtenidos duplicaban a los moles obtenidos partiendo de 18-OHB. Por otro lado, se volvió a comprobar que 18-DAL es mejor precursor para ALDO que 18-OHB.

- Se estudiaron los niveles séricos y endógenos adrenales de corticosterona y de aldosterona, como así también la actividad enzimática de la transformación de DOC a ALDO usando como animal de estudio al Lagostomus maximus maximus. Mediante los experimentos realizados utilizando animales control y tratados con litio, se observó que la vizcacha es más sensible a estos tratamientos que la rata, animal usualmente utilizado en este tipo de estudios. Se puede concluir que dado que el litio produce esta clase de efectos colaterales en estos animales, se debería estudiar en humanos si dichos efectos se repiten en los tratamientos crónicos con el ión Li^{+}

Bibliografía

Capítulo 8 Bibliografía

1. **Cuvier, G.** *Lecons d'anatomie comparée*. Paris: 1805.

2. **Huschke, E.** Capsules surrénales. In: *Encyclopedia of anatomy*, AnonymousParis: 1845, p. 330.

3. **Ecker, A.** *Der feinere Bau der Nebennieren beim Menschen und den vier Wirbeltheirclassen*. Braunschweig, 1846.

4. **Arnold, F.** Der Kopfteil des vegatativen Nervensystems. *Salzburger Medizinische Zeitung* 1831: 31, 301.

5. **Addison, T.** *On the constitutional and local effects of disease of suprarenal capsules*. London: Highley, 1855.

6. **Brown-Séquard, E.** Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales. *Arch.Gén.Méd.* 8: 385, 1856.

7. **Harley, G.** *The histology of the suprarenal capsules*. Lancet, 1858, p. 511

8. **Arnold, J.** Ein Beitrag zu der feiner Struktur und dem Chemismus der Nebennieren. *Virchows Arch* 35: 64, 1866.

9. **Balfour, F.M.** *Monograph on the development of the Elasmobranch fishes*. London: 1878.

10. **Mitsukuri, K.** On the development of the suprarenal bodies in Mammalia. *Q.J.Microsc.Sci.* 22: 17, 1882.

11. **Hechter, O.** The biogenesis of adrenal cortical steroids. 115, 1951. Conference on the Adrenal Cortex, Josiah Macy Jr. Foundation, New York. Personal Communication

12. **Simpson, S.A., J.F. Tait, and E.I. Bush.** Secretion of a salt-retaining hormone by the mammalian adrenal cortex. *Lancet II*, 226, 1952.

13. **Tait, J.F. and S.A.S. Tait.** A short history of aldosterone. *Trends Biochem.Sci* 4: 273, 1998.

14. **Bush, I.E. and A.A. Sandberg.** Adrenocortical hormones in human plasma. *J.Biol.Chem.* 205: 783, 1953.

15. **Simpson, E.R., J.F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euw, O. Schindler, and T. Reichstein.** Konstitution des Aldosterons, des neuen Mineralocorticoids. *Experientia* 10: 132, 1954.

16. **Luetscher, J.A. and B.B. Johnson.** Chromatographic separation of the sodium-retaining corticoid from the urine of children with nephrosis, compared with observations on normal children. *J.Clin.Invest.* 33: 276, 1954.

17. **Conn, J.W.** Primary aldosteronism: A new clinical syndrome. *J.Lab.Clin.Med.* 45: 3, 1955.

18. **Soffer, L.S., R.I. Dorfman, and J.L. Garblove.** The anatomy, morfologic structure and embryology of the adrenals. In: *The human adrenal gland*, edited by Lea & Febiger. Philadelphia: Lea & Febiger, 1961,

19. **Nussdorfer, G.G.** Effects of ACTH and dexamethasone on the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex: an ultrastructural stereologic study *Acta Endocrinol.(Copenh.)*. 85: 608-614, 1977.

20. **Yanagibashi, K., M. Haniu, J.E. Shively, W.H. Shen, and P.F. Hall.** The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11b-,18 hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J.Biol.Chem.* 261: 3556-3562, 1986.

21. **Ogishima, T.** Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology.* 130: 2971-2977, 1992.

22. **Sibernagl, S. and A. Despopoulos.** Sistema endocrino y hormonas. In: *Atlas de fisiologia*, Anonymous. España: Folium, p. 212-248, 1983.

23. **Hayano, M., A. Saito, D. Stone, and R.I. Dorfman.** Hydroxylation of steroids by microorganisms in the presence of labeled oxygen. *Biochim.Biophys.Acta* 21: 380-381, 1956.

24. **Berne, R.M. and M.N. Levy.** El sistema endocrino. In: *Fisiología*, AnonymousBuenos Aires: Editorial Medica Panamericana, p. 1040-1075, 1987.

25. **Samuels, L.T. and D.T. Nelson.** Biosynthesis of corticoids. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology VI*, Anonymous, p. 55-68, 1975.

26. **Kondo, E. and T. Mitsugi.** Microbiological synthesis of aldosterone from cortisone. *J.Amer.Chem.Soc.* 87: 4655-4656, 1965.

27. **Kirk, D.N.** A sythesis of 11,18,21- trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione ("18hydroxy-corticosterone"). *Chem.Commun.* 77-78, 1976.

28. **Damasco, M.C. and C.P. Lantos.** The existence of two interconvertible forms of 18-hydroxycorticosterone: is one of them an active precursor of aldosterone. *J.Steroid Biochem.* 6: 69-74, 1975.

29. **Aragonés, A., E.G. Gross, C.P. Lantos, and G.A. Locascio.** Less polar forms and derivatives of 18 hydroxy-corticosterone. *J.Steroid Bichem.* 9: 175-180, 1978.

30. **Usa, T.** M and L forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone and 18-hydroxycorticosterone: factors influencing conversion, stability and immunological properties. *J.Steroid Biochem.* 10: 557-562, 1979.

31. **Genard, P., M. Palem--Vliers, J. Denoel, H. Van Cauwenberge, and W. Eechaute.** Molecular configuration and conformation of aldosterone, 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone and a new urinary 18-hydroxy-steroid- an NMR study. *J.Steroid Biochem.* 6: 201-210, 1975.

32. **Hall, P.F.** Role of cytochrome p-450 in the biosynthesis of steroid hormone. *Vitamines and hormones* 42: 315-367, 1985.

33. **Garfinkel, D.** Preparation and properties of microsomal DPNH-cytochrome c reductase. *Arch.Biochem.Biophys.* 71: 111-121, 1958.

34. **Klingenberg, M.** Pigments of rat liver microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* 75: 376-386, 1958.

35. **Chance, B.** Techniques for assay of the respiratory enzymes. In: *Methods in enzymology*, edited by S.P.&.K.N.O. Colowick. New York: Academic Press, p. 273, 1957.

36. **Ryan, K.J. and L.L. Engel.** Hydroxilation of steroids at carbon 21. *J.Biol.Chem.* 225: 103-114, 1957.

37. **Estabrook, R.W., D.Y. Cooper, and O. Rosenthal.** The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C_{21} hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem.Z.* 338: 741-755, 1963.

38. **Omura, T. and R. Sato.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for hemoprotein nature. *J.Biol.Chem.* 239: 2370-2378, 1964.

39. **Omura, T. and R. Sato.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome. II. Solubilization, purification, and properties. *J.Biol.Chem.* 239: 2379-2385, 1964.

40. **Cooper, D.Y., S.S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal, and R.W. Estabrook.** Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147: 400-402, 1965.

41. **Gonzalez, F.J.** The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacologycal Reviews* 40: 243-288, 1989.

42. **Nebert, D.W. and F.J. Gonzalez.** P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann.Rev.Biochem.* 56: 945-993, 1987.

43. **Halkerston, I.D.K., J. Eichhorn, and O. Hechter.** A requirement for reduced triphosphopyridine nucleotide for cholesterol side chain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 236: 374-380, 1961.

44. **Mason, H.S.** Mechanism of oxigen metabolism. *Advan.Enzymol.* 19: 79-233, 1957.

45. **Ewald, W., H. Werbin, and I.L. Chaikoff.** Evidence for two substrate-specific D5-3-ketosteroid isomerases in beef adrenal glands, and their separation from 3b-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* 81: 199-201, 1964.

46. **Kruskemper, H., E. Forchielli, and H.J. Ringold.** D5-3-Keto isomerases: specificity and inhibition studies in bovine adrenal homogenate fractions and distribution in rat tissue. *Steroids* 3: 295-309, 1964.

47. **Beyer, K.F. and L.T. Samuels.** Distribution of steroid-3b-ol-dehydrogenase in cellular structures of the adrenal gland. *J.Biol.Chem.* 219: 69-76, 1956.

48. **Koritz, S.B.** The convertion of pregnenolone to progesterone by small particles from rat adrenal. *Biochemistry* 3: 1098-1102, 1964.

49. **Shikita, M. and P.F. Hall.** Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: An enzyme for the side-chain cleavage of cholesterol,II. Subunit structure. *J.Biol.Chem.* 248: 5605-5609, 1973.

50. **Omura, T., E. Sanders, R.W. Estabrook, D.Y. Cooper, and O. Rosenthal.** Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein funtional as a reduced triphosphapyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch.Biochem.Biophys.* 117: 660-673, 1966.

51. **Nakajin, S., M. Shinoda, M. Haniu, J.E. Shively, and P.F. Hall.** The C_{21} steroid side-chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsome: Purification and characterization of the 17α-hydroxylase/$C_{17,20}$-lyase cytochrome P-450. *J.Biol.Chem.* 256: 3971-3976, 1984.

52. **Watanuki, M., B.E. Tilley, and P.F. Hall.** Purification and properties of cytochrome P-450 (11β and 18-hydroxylase) from bovine adrenocortical mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 483: 236-247, 1977.

53. **Bjorkhem, I. and K.E. Kalmar.** 18-hydroxylation of deoxycorticosterone by reconstructed systems from rat and bovine adrenal. *Eur.J.Biochem* 51: 145-154, 1975.

54. **Rapp, J.P. and L.K. Dahl.** Mutant forms of cytochrome P-450 controlling both 18- and 11β-steroid hydroxylation in the rat. *Biochemistry* 15: 1235-1242, 1976.

55. **Harding, B.W., L.D. Wilson, S.H. Wong, and D.T. Nelson.** Electron carriers of the rat adrenal and the 11β hydroxylating sistem. *Steroids* 2: 51-77, 1965.

56. **Nakajin, S. and P.F. Hall.** Testicular microsomal cytochrome P-450 for C21 steroid side chain cleavage. Spectral and binding studies. *J.Biol.Chem.* 256: 6134-6139, 1981.

57. **Nakajin, S. and P.F. Hall.** Side-chain cleavage of C21 steroids by testicular microsomal cytochrome P-450 (17 alpha-hydroxylase/lyase): involvement of heme. *J.Steroid Biochem.* 3: 1345-1348, 1983.

58. **Mitani, F.** Cytochrome P-45011 beta and P-450scc in adrenal cortex: zonal distribution and intramitochondrial localization by the horseradish peroxidase-labeled antibody method. *J.Histochem.Cytochem.* 30: 1066-1074., 1982.

59. **Jefcoate, C.R.** Cytochrome P-450 of bovine adrenal mitochondria. Ligand binding to two forms resolved by EPR spectroscopy. *J.Biol.Chem.* 251: 3706-3715., 1976.

60. **Boguslawski, W.** Cytochrome P-450 and steroidogenic activities of the human placental mitochondria. *J.Steroid Biochem.* 6: 771-775, 1982.

61. **Shaw, D.** Biogenesis of oestrogens from (14C)testosterone in the mitochondrial fraction of the human placenta. *Biochem.J.* 113: 737-739, 1969.

62. **Satre, M., P.V. Vignais, and S. Idelman.** Distribution of the steroid 11-β-hydroxylase and the cytochrome P-450 in membranes of beef adrenal cortex mitochondria. *FEBS Lett.* 5: 135-140, 1969.

63. **Yago, N. and S. Ichii.** *J.Biochem.* 65: 215, 1969.

64. **Yago, N., S. Kobayashi, S. Sekiyama, H. Kurokawa, and Y. Iwai.** Further studies on the submitochondrial localization of cholesterol side chain-cleaving enzyme system in hog adrenal cortex by sonic treatment. *J.Biochem.* 68: 775-783, 1970.

65. **Hornsby, P.J.** Regulation of cytochrome P-450-supported 11β-hydroxilation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J.Biol.Chem.* 255: 4020-4027, 1980.

66. **Bjorkhem, I. and K.E. Kalmar.** Common characteristics of the cytochrome P-450 system involved in 18- and 11-βhydroxilation of deoxycorticosterone in rat adrenals. *Eur.J.Biochem* 51: 145-154, 1977.

67. **Bjorkhem, I. and K.E. Kalmar.** 18-hydroxylation of DOC by reconstructed systems from rat and bovine adrenals. *Eur.J.Biochem* 51: 145-154, 1977.

68. **Momoi, K., M. Okamoto, S. Fujii, C.Y. Kim, Y. Miyake, and T. Yamano.** 19-Hydroxylation of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone catalyzed by cytochrome P-45011 beta of bovine adrenocortex. *J.Biol.Chem.* 258: 8855-8860, 1983.

69. **Watanuki, M., B.E. Tilley, and P.F. Hall.** Cytochrome P-450 for 11β- and 18-hydroxylase activities of bovine adrenocortical mitochondria: One enzyme or two? *Biochemistry* 17: 127-130, 1978.

70. **Ayers, J., J. Eichhorn, O. Hechter, N. Saba, and S.A.S. Tait.** Some studies on the biosynthesis of aldosterone and other adrenal steroids. *Acta Endocrinol.* 33: 27-58, 1960.

71. **Sheppard, H., R. Swanson, and F. Mowles.** Purification of cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 50: 289-293, 1963.

72. **Fraser, R. and C.P. Lantos.** 18-hydroxycorticosterone: a review. *J.Steroid Biochem.* 273-286, 1978.

73. **Arison, B.H., M.D. Chu, and S. Ülick.** A proton magnetic resonanse study of the 18-hydroxy derivatives of cortisol and corticosterone. *J.Steroid Biochem.* 17: 467-469, 1982.

74. **Aupetit, B., R. Toury, and J.C. Legrand.** Relation between energy metabolism in mitochondria and conversion of 18-hydroxycorticosterone to aldosterone in adrenals. *Biochemie* 62: 823-827, 1980.

75. **Aupetit, B., C. Accarie, N. Emeric, V. Vonarx, and J.C. Legrand.** The final step of aldosterone biosynthesis requires reducing power it is not a dehidrogenation. *Biochim.Biophys.Acta* 752: 73-78, 1983.

76. **Cozza, E.N., M.F. Foecking, and C.E. Gomez-Sanchez.** The binding of cortisol to adrenal mitochondria. *J.Steroid Biochem.* 35: 511-514, 1990.

77. **Ülick, S.** Diagnosis and nomenclature of the disorders of the terminal portion of the aldosterone biosynthetic pathway. *J.Clin.Endocr.Metab.* 92-96, 1976.

78. **Marusic, E., A. White, and A.R. Aedo.** Oxidative reactions in the formation of an aldehyde group in the biosynthesis of aldosterone. *Arch.Biochem.Biophys.* 157: 320-321, 1973.

79. **Kojima, I.** Oxygenation of 18-hydroxycorticosterone as the final reaction for aldosterone biosynthesis. *Acta Endocrinol.(Copenh.).* 107: 395-400, 1984.

80. **Yanagibashi, K.** Conversion of 11-deoxycorticosterone and corticosterone to aldosterone by cytochrome P-450 11 beta-/18-hydroxylase from porcine adrenal. *J.Steroid Biochem.* 29: 665-675, 1988.

81. **Hall, P.F.** Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids.* 48: 131-196, 1986.

82. **Cozza, E.N., G. Burton, N.R. Ceballos, C.P. Lantos, M. Harnik, and I. Scott.** 18-deoxyaldosterone and other less polar forms of 18-hydroxycorticosterone as aldosterone precursors in rat adrenals. *J.Steroid Biochem.* 22: 665-672, 1985.

83. **Müller, J.** *Regulation of aldosterone production.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 1-365, 1988.

84. **Hornsby, P.J. and J.F. Crivello.** The role of phospholipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. *Mol.Cell.Endocr.* 30: 123-147, 1983.

85. **Yanagibashi, K., M. Haniu, J.E. Shively, W.H. Shen, and P.F. Hall.** The synthesis of aldosterone by the rat adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11β-,18hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J.Biol.Chem.* 261: 3556-3562, 1986.

86. **Lombardo, A., M. Laine, G. Defaye, N. Monnier, C. Guidicelli, and E.M. Chambaz.** Molecular organization (topography) of Cytochrome P-450β in mitochondrial membrane and phospholipid vesicles as studied by trypsinolysis. *Biochim.Biophys.Acta* 863: 71-81, 1986.

87. **Hamamoto, I., A. Hiwatashi, and Y. Ichikawa.** Zonal distribution of cytochrome P-450 and related enzymes of bovine adrenal cortex-quantitative assay of concentrations and total contents. *J.Biochem.* 99: 1743-1748, 1985.

88. **Lauber, M., S. Sugano, T. Ohnishi, M. Okamoto, and J. Müller.** Aldosterone biosynthesis and cytochrome P-$450_{11\beta}$: evidence for two different forms of the enzyme in rat. *J.Steroid Biochem.* 26: 693-698, 1987.

89. **Kramer, R.E., S. Gallant, and A.C. Brownie.** The role of cytochrome P-450 in the action of sodium depletion on aldosterone biosynthesis in rats. *J.Biol.Chem.* 254: 3953-3958, 1979.

90. **Marusic, E. and P.J. Mulrow.** Stimulation of aldosterone biosynthesis in adrenal mitochondria by sodium depletion. *J.Clin.Invest.* 46: 2101-2108, 1967.

91. **Boyd, J.E., W.P. Palmore, and P.J. Mulrow.** Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat. *Endocrinology* 88: 556-565, 1971.

92. **Baumann, K. and J. Müller.** Effect of potassium intake on the final steps of aldosterone biosynthesis in the rat. I. 18-hydroxylation and 18-hydroxydehydrogenation. *Acta Endocr.Copenh.* 69: 701-717, 1972.

93. **Sugano, S., T. Ohnishi, N. Hatae, Y. Ishimura, H. Fujita, T. Yamano, and M. Okamoto.** Monoclonal antibodies against bovine adrenal cytochrome $P\text{-}450_{11\beta}$ and cytochrome $P\text{-}450_{scc}$. Their isolation, characterization and application to inmunohistochemical analysis of adrenal cortex. *J.Steroid Biochem.* 23: 1013-1021, 1985.

94. **Lauber, M. and J. Müller.** Purification and characterization of two distinct forms of rat adrenal cytochrome P-450 11β: funtional and structural aspects. *Arch.Biochem.Biophys.* 109-119, 1989.

95. **Yabu, M., T. Senda, Y. Nonaka, N. Matsukawa, M. Okamoto, and H. Fujita.** Localization of the gene transcripts of 11β-hydroxilase and aldosterone synthase in the rat adrenal cortex by in situ hybrydization. *Histochemistry* 96: 391-394, 1991.

96. **Ho, M.M. and G.P. Vinson.** 11β-hydroxylase gene expression in the rat adrenal cortex. *Journal of Endocrinology* 139: 301-306, 1993.

97. **Sander, M., D. Ganten, and S. Mellon.** Role of adrenal renin in the regulation of adrenal steroidogenesis by corticotropin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91: 148-152, 1994.

98. **Mitani, F., H. Suzuki, J.I. Hata, T. Ogishima, H. Shimada, and Y. Ishimura.** A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* 135: 431-438, 1994.

99. **Mukai, K., M. Imai, H. Shimada, Y. Okada, T. Ogishima, and Y. Ishimura.** Structural differences in 5'-flanking regions of rat cytochrome P-450_{aldo} and P-$450_{11\beta}$ genes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 180: 1187-1193, 1991.

100. **Malee, M.P. and S.H. Mellon.** Zone-specific regulation of two messenger RNAs for P-450c11 in the adrenals of pregnant and nonpregnant rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 4731-4735, 1991.

101. **Kawamoto, T., Y. Mitsuuchi, K. Toda, Y. Yokoyama, K. Miyahara, S. Miura, T. Ohnishi, Y. Ichikawa, K. Nakao, H. Imura, S. Ülick, and Y. Shizuta.** Rol of steroid 11β-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 1458-1462, 1992.

102. **Domalick, L.J., D.D. Chaplin, M.S. Kirkman, R.C. Wu, W. Liu, T.A. Howard, M.F. Seldin, and K.L. Parker.** Different isoenzymes of mouse 11β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Molec.Endocr.* 5: 1853-1861, 1991.

103. **Lifton, R.P., R.G. Dluhy, M. Powers, G.M. Rich, S. Cook, S. Ülick, and J.M. Laloucl.** A chimaeric 11β-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: 262-265, 1992.

104. **Calvo, J.C.** Photoperiod, follicle-stimulating hormone receptors, and testicular function in vizcacha (Lagostomus maximus maximus). *Biol.Reprod.* 35: 822-827, 1986.

105. **Fuentes, L.B.** Seasonal variations in the testis and epididymis of vizcacha (Lagostomus maximus maximus). *Biol.Reprod.* 45: 493-497, 1991.

106. **Greenspan, K.** Retention and distribution patterns of lithium, a pharmacological tool in studying the pathophysiology of manic-depressive psychosis. *Am.J.Psychiatry.* 125: 512-519, 1968.

107. **Baukal, A.J.** Binding sites for inositol trisphosphate in the bovine adrenal cortex. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 133: 532-538, 1985.

108. **Enyedi, P.** Polyphosphoinositide metabolism in adrenal glomerulosa cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 41: 105-112, 1985.

109. **Balla, T.** Effects of lithium on angiotensin-stimulated phosphatidylinositol turnover and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells: a possible causal relationship. *FEBS Lett.* 171: 179-182, 1984.

110. **Garcia Aseff, S., G. Orellano, and J.A. Guzman.** Lithium effect in vizcacha, (Lagostomus maximus maximus). A comparative biochemical and histological study with rat. *Metal ion in biology and medicine* 4: 442-444, 1996.

111. **Biglieri, E.G.** Primary aldosteronism. *Curr.The.Endocrinol.Metab.* 6: 170-172, 1997.

112. **Naruse, M., H. Demura, K. Naruse, A. Tanabe, T. Seki, and T. Yoshimoto.** Variant forms of primary aldosteronism: reconsideration of the differential diagnosis and treatment. *Intern.Med.* 36: 919-921, 1996.

113. **Matsuda, A., M. Beniko, A. Ikota, M. Yamazaki, S. Koizumi, H. Mizumoto, T. Watanabe, K. Matsuya, K. Kunita, Y. Mashio, and H. Sasano.** Primary aldosteronism with bilateral multiple aldosterone-producing adrenal adenomas. *Intre.Med.* 35: 970-975, 1996.

114. **Chen, L., T.I. Lee, H.D. Lin, H.C. Wang, W.Y. Liu, and K.T. Tang.** Primary aldosteronism due to unilateral adrenal hyperplasia: a case report. *Hung HUA Hsueh Tsa Chih (Taipei)* 59: 114-120, 1997.

115. **Gomez-Sanchez, C.E.** 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol, steroids from the transitional zone. *Endocr.Res.* 10: 609-615, 1984.

116. **Gomez-Sanchez, C.E., E.P. Gomez-Sanchez, J.S. Smith, M.W. Ferris, and M.F. Foecking.** Receptor binding and biological activity of 18-oxocortisol. *Endocrinology* 116: 6-10, 1985.

117. **De Matteo, R., C.N. May, J.P. Coghlan, T. Kurosawa, T. Yoshimura, H. Chiba, and J.G. McDougall.** Investigation of the mineralocorticoid and hipertensinogenic activity of 18-hydroxycortisol in conscious sheep. *Steroids* 62: 351-357, 1997.

118. **Cozza, E.N., M.R. Chavarri, M.F. Foecking, and C.E. Gomez-Sanchez.** Synthesis of 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol in bovine adrenal zona glomerulosa mitochondria. *Soc.Exp.Biol.Med.* 203: 317-322, 1993.

119. **Ülick, S., M.D. Chu, and M. Land.** Biosynthesis of 18-oxocortisol by aldosterone producing adrenal tissue. *J.Biol.Chem.* 258: 5498-5520, 1983.

120. **Matkovic, L.B. and E.N. Cozza.** Enzimología de la biosíntesis de aldosterona. Una revisión. *ABCLDL* XXIX: 159-165, 1995.

121. **Connell, J.M., A.J. Jamieson, E. Davies, M. Ingram, A. Soto, and R. Fraser.** 11 beta-hydroxylase activity in glucocorticoid supresible hyperaldosteronism: lessons for escential hypertension? *Endocr.Res.* 22: 691-700, 1996.

122. **Pascoe, L. and K.M. Curnow.** Genetic recombination as a cause of inherited disorders of aldosterone and cortisol biosynthesis and a contributor to genetic variation in blood presure. *Steroids* 60: 22-27, 1995.

123. **White, P.C., J. Dupont, M.I. New, E. Lieberman, Z. Hochberg, and A. Rosler.** A mutation in Cyp11B1 (Arg448-His) associated with steroid 11β-hydroxilase deficiency in Jews of Morocen origin. *J.Clin.Invest.* 87: 1644-1667, 1991.

124. **Curnow, K.M., L. Slutsker, J. Vitek, T. Cole, P.W. Speiser, M.I. New, P.C. White, and L. Pascoe.** Mutation in the Cyp11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hipertension cluster in exon 6,7 and 8. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90: 4552-4556, 1992.

125. **Pascoe, L., K.M. Curnow, L. Slutsker, A. Rosler, and P.C. White.** Mutation in human Cyp11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 4996-5000, 1992.

126. **Misuuchi, Y., T. Kawamoto, K. Miyahara, S. Ulick, D.H. Morton, Y. Naii, I. Kuribayashi, K. Toda, T. Hara, T. Orii, K. Yasuda, S. Miura, Y. Yamamoto, H. Imura, and Y. Shizuta.** Congenitally defective aldosterone biosynthesis *in* humans: inactivation of the P450C18 gene (CYP11B2) due to nucleotide deletion in CMO I deficient patients. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 190: 864-869, 1993.

127. **Ülick, S., E. Gautier, K.K. Vetter, J.R. Marbello, S. Yaffe, and C.V. Lowe.** An aldosterone biosynthetic defect in a salt losing disorder. *J.Clin.Endocr.Metab.* 24: 669-672, 1964.

128. **Viser, H.K.A. and W.S. Cost.** A new heredaty deffect in the biosynthesis of aldosterone: Urinary C21-corticosteroid pattern in three related patients with a salt-losing syndrome, sugesting an 18-oxidation deffect. *Acta Endocrinol.* 589-612, 1964.

129. **Johnston, J.O., C.L. Wright, and G.W. Holbert.** Enzyme-activated inhibitors of steroidal hydroxylases. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 52: 17-34, 1995.

130. **Numazawa, M.** Aromatase inactivation by a suicide substrate, androst-5-ene-4,7,17-trione: the 5beta,6beta-epoxy-19-oxo derivative, as a possible reactive electrophile irreversibly binding to the active site. *Biol.Pharm.Bull.* 20: 490-495, 1997.

131. **Numazawa, M.** Mechanism for aromatase inactivation by a suicide substrate, androst-4-ene-3,6,17-trione. The 4 beta, 5 beta-epoxy-19-oxo derivative as a reactive electrophile irreversibly binding to the active site. *Biochem.Pharmacol.* 52: 1253-1259, 1996.

132. **Rafestin-Oblin, M.E., B. Couette, C. Barlet-Bas, L. Cheval, A. Viger, and A. Doucet.** Renal action of progesterone and 18-substituted derivatives. *Am.J.Physiol.* 260: F828-32, 1991.

133. **Viger, A.** Synthesis and activity of new inhibitors of aldosterone biosynthesis. *J.Steroid Biochem.* 30: 469-472, 1988.

134. **Crivello, J.F., P.J. Hornsby, and G.N. Gill.** Metyrapone an antioxidants are required to maintain aldosterone biosynthesis by cultured bovine adrenocortical zona glomarulosa cells. *Endocrinology* 111: 469-479, 1982.

135. **Saffran, M. and V. Shally.** *Endocrinology* 56: 523-524, 1955.

136. **Krebs, H.A., K. Henseleit, and H. Hoppe-Seylers.** *Z.Phisiol.Chem.* 210: 33-34, 1999.

137. **Gomez-Sanchez, C.E., M.F. Foecking, M.W. Ferris, M.R. Chavarri, L. Uribe, and E.P. Gomez-Sanchez.** The production of monoclonal antibodies against aldosterone. *Steroids* 49: 581-587, 1987.

138. **Gomez-Sanchez, C.E., B.A. Murry, D.C. Kem, and N.M. Kaplan.** A direct radioinmunoassay of serum corticosterone in the rat. *Endocrinology* 96: 796-798, 1975.

139. **Munson, P., D. Rodbard, and M.L. Jaffe.** NIH Bethesda M.D.: IBM PC, 1989,

140. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254, 1976.

141. **Tallan, H.H., S. Psychoyos, and P. Greengard.** Biosynthesis of aldosterone by cell-free systems. In: *Functions of the adrenal cortex.Vol. 1*, edited by Kenneth W.McKerns. New York: Appleton-century-crofts, 1968, p. 233-258.

142. **Bush, I.E.** *The chromatography of steroids.* Pergamon Press. New York: 1961, p. 378

143. **Quesenberry, R.O. and F. Ungar.** Thin-layer chromatographic systems for adrenal corticosteroids. *Analytical Biochemistry* 8: 192-199, 1964.

144. **Cozza, E.N., N.R. Ceballos, M.C. Vila, H. Fasoli, and C.P. Lantos.** Separación por cromatografía líquida de alta presión, reversibilidad y propiedades metabólicas de

las formas menos polares de la 18-OH-B. *Anales Asoc.Quim.Argentina* 75: 551-554, 1987.

145. **Simpson, E.R. and I. Mason.** Molecular aspects of the biosynthesis of adrenal steroids. *Pharmacol.Ther.* 2: 339-369, 1976.

146. **Matsukawa, N., Y. Nonaka, Z. Ying, J. Higari, T. Ogihara, and M. Okamoto.** Molecular cloning and expression of cDNAs: encoding rat aldosterone syntase: Variants of cytochrome P-450 11β. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 169: 245-252, 1997.

147. **Imai, M., H. Shimada, Y. Okada, Y. Matsushima-Hibiya, T. Ogishima, and Y. Ishimura.** Molecular cloning of a cDNA encoding aldosterone syntase cytochrome P-450 in rat adrenal cortex. *FEBS Lett.* 263: 299-302, 1990.

148. **Kawamoto, T., Y. Mitsuuchi, T. Ohnishi, Y. Ichikawa, Y. Yokoyama, H. Sumimoto, K. Toda, K. Miyahara, and I. Kuribayashi.** Cloning and espression of a cDNA for human cytochrome P450 aldo as related to primary aldsoteronism. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 173: 309-316, 1991.

149. **Hall, P.F.** Steroidogenic cytochromes P-450 do the properties of the homogeneous enzymes reveal important aspects of the regulation of steroid synthesis in vivo. *Endocr.Res.* 10: 311-317, 1984.

150. **Okamoto, M. and Y. Nonaka.** Molecular biology of rat steroid 11β-hydroxylase [P450 (11β)] and aldosterone synthase [P45011β,aldo)]. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 41: 415-419, 1992.

151. **Seybert, D.W.** Lipid regulation of bovine cytochrome P450 11β activities. *Arch.Biochem.Biophys.* 279: 188-194, 1990.

152. **Wada, A., M. Okamoto, Y. Nonaka, and T. Yamano.** Aldosterone biosynthesis by a reconstructed cytochrome P-45011β system. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 119: 365-371, 1984.

153. **Ohnishi, T., A. Wada, Y. Nonaka, M. Okamoto, and T. Yamano.** Effect of phospholipid on aldosterone biosynthesis by a cytochrome P-450 11β-reconstructed system. *Biochem.Int.* 9: 712-723, 1984.

154. **Staats, D.A. and H.D. Colby.** Modulation of the effects of ascorbic acid on lipid peroxidation by tocopherol in adrenocortical mitochondria. *J.Steroid Biochem.* 32: 609-611, 1989.

155. **Oertle, M. and J. Müller.** Two types of cytochrome P-450 11β in rat adrenals separate regulation of gene expression. *Mol.Cell.Endocr.* 91: 201-209, 1993.

156. **Ogishima, T., F. Mitani, and Y. Ishimura.** Isolation of aldosterone synthase cytocrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 264: 10935-10938, 1989.

157. **Ogishima, T., H. Suzuki, J.I. Hata, F. Mitani, and Y. Ishimura.** Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome 11β in rat adrenal cortex: histochemical basis for the funtiona' zonation. *Endocrinology* 130: 2971-2977, 1992.

158. **Ho, M.M. and G.P. Vinson.** 11β-hydroxylase gene expression in the rat adrenal cortex. *J.Endocrinol.* 139: 301-306, 1993.

159. **Gomez-Sanchez, C.E., M.W. Ferris, M.F. Foecking, and E.P. Gomez-Sanchez.** Synthesis of 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol in bovine adrenal slices. *J.Steroid Biochem.* 33: 595-598, 1989.

160. **Emeric-Blanchouin, N., M. Zenatti, V. Vonarx, G. Schaison, and B. Aupetit-Faisan.** Cortisol and testosterone: inhibitory agents of the mineralocorticoid pathway. Is there a physiopathologycal meaning in adrenal tumors? *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 41: 823-826, 1992.

161. **Ülick, S.** Normal and alternated pathways in aldosterone biosynthesis. *Proceedings of the Fourth International Congress on Endocrinology* 751-766, 1973.

162. **Ülick, S., D. Marver, W.R. Adam, and J.W. Funder.** The mineralocorticoid antagonist activitie of an 11β, 18-oxidopregnane. *Endocrinology* 104: 1352-1356, 1979.

163. **Prost, M. and B.F. Maume.** Hormones steroides de la surrenale de rat: Analyse des 18-hydroxycorticosteroides par chromatographie gaz-liquide couplee a la spectrometrie de masse et par fragmentographie de masse. *J.Steroid Biochem.* 5: 133-144, 1974.

164. **Ceballos, N.R., E.N. Cozza, and C.P. Lantos.** Corticoidogenesis in Bufo arenarum H.I) In vitro biosynthesis of [3H]corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28 C and 37 C. *C.Gen.Comp.Endocrinol.* 138-147, 1983.

165. **Gonzalez, C.B., E.N. Cozza, M.E. Bedners, C.P. Lantos, and A. Aragones.** Progesterone and its reductive metabolism in steroidogenic tissues of the developing hen. *Gen.Comp.Endocrinol.* 51: 384-393, 1983.

166. **Chu, M.D. and S. Ülick.** Isolation and identification of 18-hydroxycortisol from the urine of patients with primary aldosteronism. *J.Biol.Chem.* 258: 2218-2224, 1982.

167. **Gomez-Sanchez, C.E., M. Montgomery, A. Ganguly, O.B. Holland, E.P. Gomez-Sanchez, C.E. Grim, and M.H. Weinberger.** Elevated urinary excretion of 18-oxocortisol in glucocorticoid suppresible aldosteronism. *J.Clin.Endocr.Metab.* 59: 1022-1024, 1984.

168. **Müller, J.** 11β-hydroxilation of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone by rat adrenal tissue: zone specificity and effect of sodium and potassium restriction. *J.Steroid Biochem.* 13: 253-257, 1980.

169. **Müller, J.** The conversion of 18-hydroxycorticosterone and 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone to aldosterone by rat adrenal tissue: Evidence for an alternative biosynthesis pathway. *J.Steroid Biochem.* 13: 245-251, 1980.

170. **Ortiz, d.M.P.** Destruction of cytochrome P-450 by vinyl fluoride, fluroxene, and acetylene. Evidence for a radical intermediate in olefin oxidation. *Biochemistry.* 21: 1331-1339, 1982.

171. **Ortiz, d.M.P.** Destruction of cytochrome P-450 by 2-isopropyl-4-pentenamide and methyl 2-isopropyl-4-pentenoate: mass spectrometric characterization of prosthetic heme adducts and nonparticipation of epoxide metabolites. *Arch.Biochem.Biophys.* 197: 524-533, 1979.

172. **Ortiz, d.M.P.** Self-catalyzed destruction of cytochrome P-450: covalent binding of ethynyl sterols to prosthetic heme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76: 746-749, 1979.

173. **Ortiz, d.M.P.** Suicidal inactivation of cytochrome P-450 Formation of a heme-substrate covalent adduct. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 83: 132-137, 1978.

174. **Defaye, G., A. Piffeteau, C. Delorme, and A. Marquet.** Specific inhibition of the last steps of aldosterone biosynthesis by 18- vinylprogesterone in bovine adrenocortical cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 57: 141-147, 1996.

175. **Gomez-Sanchez, C.E., S. Chiou, and N. Yamakita.** 18-Ethynyl-deoxycorticosterone inhibition of steroid production is different in freshly isolated compared to cultured calf zona glomerulosa cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 46: 805-810, 1993.

176. **Gan, L.S.** Effects of acetylenic and olefinic pyrenes upon cytochrome P-450 dependent benzo[a]pyrene hydroxylase activity in liver microsomes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 129: 591-596, 1985.

177. **Liu, H.** 2-Phenylphenanthridinone and related compounds: aryl hydrocarbon receptor agonists and suicide inactivators of P4501A1. *Arch.Biochem.Biophys.* 313: 206-214, 1994.

178. **Foroozesh, M., G. Primrose, Z. Guo, L.C. Bell, W.L. Alworth, and F.P. Guengerich.** Aryl acetylenes as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450- dependent monooxygenase enzymes. *Chem.Res.Toxicol.* 10: 91-102, 1997.

179. **White, I.N.** Decreased liver cytochrome P-450 in rats caused by norethindrone or ethynyloestradiol. *Biochem.J.* 166: 57-64, 1977.

180. **Garcia Canovas, F., J. Tudela, C. Martinez Madrid, R. Varon, F. Garcia Carmona, and J.A. Lozano.** Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochim.Biophys.Acta* 912: 417-423, 1987.

181. **Scheleyer, H., D.Y. Cooper, and O. Rosenthal.** Preparation of the heme protein P-450 from the adrenal cortex and some of its properties. *J.Biol.Chem.* 247: 6103-6110, 1972.

182. **Sato, H., N. Ashida, K. Suhara, E. Itagaki, S. Takemori, and M. Katagiri.** Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-$450_{11\beta}$) for the hydroxylations of corticosteroids. *Arch.Biochem.Biophys.* 190: 307-314, 1978.

183. **Matkovic, L.B., C.E. Gomez-Sanchez, C.P. Lantos, and E.N. Cozza.** Inhibition of aldosterone formation by cortisol in rat adrenal mitochondria. *Steroids* 60: 447-452, 1995.

184. **O'Hare, M.J., E.C. Nice, and M. Capp.** Reversed- and normal- phase high-performance liquid chromatography of 18-hydroxylated steroids and their derivatives. *Journal of chromatography* 198: 23-39, 1980.

185. **Dominguez, O.V.** The presence of two interconvertible forms of 18-hydroxy 11-deoxycorticosterone. *Steroids* 2: 29-49, 1965.

186. **Lichtwald, K. and M. Przybylski.** "Dimers" of aldosterone. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 24: 130-131, 1985.

187. **Cozza, E.N.** A highly lipophilic form of aldosterone. Isolation and characterization of an aldosterone dimer. *J.Steroid Biochem.* 23: 511-516, 1985.

188. **Harnik, M., S. Carmely, M. Cojocaru, and Y. Kashman.** Synthesis of 18,19-dihydroxycorticosterone. *Steroids* 47: 205-213, 1936.

189. **Bocchetta, A.** Thiroid abnormalities during Lithium treatment. *Acta Psychiatr.Scand.* 83: 193-198, 1991.

190. **Komatsu, M., H. Shimizu, T. Tsuruta, M. Kato, T. Fushimi, K. Inoue, S. Kobayashi, and T. Kuroda.** Effect of lithium on serum calcium level and parathyroid function in manic-depressive patients. *Endocr.J.* 42: 691-695, 1995.

191. **Banerji, T.K., T.A. Parkening, T.J. Collins, and A. Rassoli.** Lithium-induced changes in the plasma and pituitary levels of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in rats. *Life Sci.* 33: 1621-1627, 1983.

192. **Birch, N.J. and J.D. Phillips.** Lithium and medicine: Inorganic farmacology. *advances in Inorganic Chemistry* 36: 49-75, 1991.

193. **Moore, J.A.** An assessment of lithium using the IEHR Evaluative Process for Assessing Human Developmental and Reproductive Toxicity of Agents. IEHR Expert Scientific Committee. *Reprod.Toxicol.* 9: 175-210, 1995.

194. **Jacobbs, J.J.** Effect of Lithium Chloride on adrenocortical function in the rat. *Proceedings of the Society for experimental biology and Medicine* 157: 163-167, 1978.

195. **Garcia Aseff, S., L.B. Fuentes, A.O. Maria, J.A. Guzman, F. Mohamed, E. Munoz, A. Ribes, S. Dominguez, L. Scardapane, and O. Villegas.** [Biochemical-histological study of the effects of lithium on various organs of vizcacha (Lagostomus maximus maximus)]. *Acta Physiol.Pharmacol.Ther.Latinoam.* 45: 87-95, 1995.

196. **Llanos, A.C. and J.A. Crespo.** Ecologia de la vizcacha (Lagostomus maximus maximus Blainv.) en el nordeste de la provincia de Entre Rios. *Investigacion agricola Bs.As.* 6: 1-95, 1952.

197. **Jacobs, J.J.** Effect of lithium chloride on adrenocortical function in the rat. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 157: 163-167, 1978.