

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de aldosterona y su regulación en Bufo arenarum (Amphibia, anura)

Ceballos, Nora Raquel

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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:

Ceballos, Nora Raquel. (1999). Biosíntesis de aldosterona y su regulación en Bufo arenarum (Amphibia, anura). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3185_Ceballos.pdf

Cita tipo Chicago:

Ceballos, Nora Raquel. "Biosíntesis de aldosterona y su regulación en Bufo arenarum (Amphibia, anura)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3185_Ceballos.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA Y SU REGULACION EN *Bufo
arenarum* (AMPHIBIA, ANURA)

Nora Raquel Ceballos

Director: Dr. Carlos Pedro Lantos

Laboratorio de Esteroides, Departamento de Química Biológica, PHROM-CONICET,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

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

BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA Y SU REGULACION EN *Bufo arenarum* (AMPHIBIA, ANURA)

Nora Raquel Ceballos

Director: Dr. Carlos Pedro Lantos

Laboratorio de Esteroides, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

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

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se realizaron estudios sobre la biosíntesis de aldosterona, en la glándula interrenal de *Bufo arenarum*, a partir de distintos sustratos tales como corticosterona, 18-hidroxycorticosterona (18-OH-B) y el compuesto "N" que se biosintetiza a partir de pregnenolona pero no de progesterona. A diferencia de lo que ocurre con la 18-OH-B comercial o de rata, la proveniente de interrenales de sapo presenta una forma menos polar única y distinta de las conocidas hasta el momento.

Con respecto a la precursoridad de aldosterona que posee este esteroide 18-hidroxilado, los resultados mostrados indican que esta hormona no es intermediario en la biosíntesis de aldosterona, por lo menos en las condiciones utilizadas para los experimentos presentados en esta Tesis. También se ensayó la capacidad precursora de aldosterona que tiene corticosterona y la conclusión a la que se arribó es que la capacidad biosintética de este conocido intermediario en la síntesis de aldosterona es, también, muy baja.

Se caracterizó por diversos métodos el compuesto "N", esteroide muy polar con movilidad intermedia entre 18-OH-B y cortisol en el sistema Bush B5, como el 3 β -hidroxi-5-ene análogo de aldosterona (3 β ,11 β ,21-trihidroxi-5-pregnen-20-ona-18-al). Cuando se estudiaron las propiedades biosintéticas del compuesto "N", este esteroide demostró ser un muy buen precursor para la síntesis de aldosterona. La importante capacidad precursora de aldosterona que posee "N", a la menor precursoridad de corticosterona y a la falta de capacidad de 18-OH-B, indican que en *Bufo arenarum*, la isomenización del doble enlace Δ 5 a Δ 4 es un paso muy tardío en el camino biosintético de aldosterona. La transformación del análogo de aldosterona en el mineralocorticoide es catalizada por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ 4 isomerasa de localización mitocondrial. La actividad de la enzima

mencionada es regulada por la concentración de sodio del medio, la que parece regular la cantidad de enzima presente en aquella fracción.

Palabras clave: Aldosterona; esteroidogénesis; interrenal; anfibios; 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa.

Los experimentos y resultados de esta Tesis fueron publicados parcialmente ,y forman parte de los siguientes artículos:

* Corticoidogenesis in *B. arenarum* H. I. In vitro biosynthesis of ³H-pregnenolone and ³H-corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28 C and 37 C.
Ceballos, N.R., Cozza, E.N., and Lantos, C.P..
Gen.Comp.Endocrinol., **51**, 138-147. 1983.

* Determination of progesterone and corticosterone contents of steroidogenic tissues by a recycling HPLC technique. A critical study of collection conditions.
Cozza, E.N., Gonzalez, C.B., Ceballos, N.R., Aragonés, A., and Lantos, C.P..
Anales Asoc. Qca. Arg., **71**, 483-485. 1983.

* Corticosteroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H: evidence for a precursor role for an aldosterone 3 β -hydroxy-5ene analogue (3 β ,11 β ,21-trihydroxy -20-oxo-5- pregnen 18-al).
Ceballos, N.R., Shackleton, C., Hamik, M., Cozza, E.N., Gros, E.G., and Lantos, C.P..
Biochem. J., **292**, 143-147. 1993.

* Mitochondrial localization of the 3 β hydroxysteroid dehydrogenase- isomerase in the interrenal of the toad *Bufo arenarum*.
Pozzi, A., Lantos, C.P. and Ceballos, N.R.
Gen. Comp. Endocrinol., **103**(2), 176-181. 1996.

THE BIOSYNTHESIS OF ALDOSTERONE IN *Bufo arenarum* (AMPHIBIA, ANURA) AND ITS REGULATION

Nora Raquel Ceballos

Director: Dr. Carlos Pedro Lantos

University of Buenos Aires, Faculty of Exact and Natural Sciences

Thesis in fulfilment of the Degree of a Doctor of the University of Buenos Aires

SUMMARY

This thesis describes studies on the biosynthesis of aldosterone by the interrenal gland of *Bufo arenarum* from substrates such as corticosterone, 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) and compound "N", a metabolite synthesized from pregnenolone but not from progesterone. At variance with commercial or rat 18-OH-B, toad 18-OH-B exhibits only one single "less polar form". This form differs from those currently described.

Under the present conditions, that 18-hydroxylated steroid is not an intermediate in the biosynthesis of aldosterone. Likewise, corticosterone proved to be a poor precursor for the mineralocorticoid.

Several methods were applied to the study and characterization of compound "N", a highly polar metabolite migrating in the Bush B₅ paper-chromatographic system as migrates the 3 β -hydroxy-5-ene analog of aldosterone (3 β ,11 β ,21-trihydroxy-5-pregnen-20-one-18-al). This steroid showed to be a good precursor for aldosterone. Its precursorship, surpassing by far those exhibited by 18-OH-B or even corticosterone, suggests that isomerization $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ is a final step of aldosterone biosynthesis. The transformation of the aldosterone-analog into aldosterone is catalysed by the enzyme 3 β hydroxysteroid dehydrogenase- Δ^4 isomerase, of mitochondrial localization. Enzyme activity is regulated by the sodium concentration of the medium, which apparently controls the amount of enzyme in mitochondria.

Key words: Aldosterone; steroidogenesis; interrenal; amphibians; 3 β -hidroxisteroid dehydrogenase-isomerase.

Experiments and results of this Thesis are partially included in the following articles:

* Corticoidogenesis in *B. arenarum* H. I. In vitro biosynthesis of ^3H -pregnenolone and ^3H -corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28 C and 37 C.
Ceballos, N.R., Cozza, E.N., and Lantos, C.P..
Gen.Comp.Endocrinol., **51**, 138-147. 1983.

* Determination of progesterone and corticosterone contents of steroidogenic tissues by a recycling HPLC technique. A critical study of collection conditions.
Cozza, E.N., Gonzalez, C.B., Ceballos, N.R., Aragonés, A., and Lantos, C.P..
Anales Asoc. Qca. Arg., **71**, 483-485. 1983.

* Corticosteroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H: evidence for a precursor role for an aldosterone 3β -hydroxy-5ene analogue ($3\beta,11\beta,21$ -trihydroxy -20-oxo-5- pregnen 18-al).
Ceballos, N.R., Shackleton, C., Hamik, M., Cozza, E.N., Gros, E.G., and Lantos, C.P..
Biochem. J., **292**, 143-147. 1993.

* Mitochondrial localization of the 3β hydroxysteroid dehydrogenase- isomerase in the interrenal of the toad *Bufo arenarum*.
Pozzi, A., Lantos, C.P. and Ceballos, N.R.
Gen. Comp. Endocrinol., **103**(2), 176-181. 1996.

Dedicada a

MI MADRE, por que todavía está

MI PADRE, aunque ya no esté

RITA, por estar

SERGIO, por haber estado

LA VIDA, por que siempre me sorprende

Agradezco,

- al Dr. Carlos Lantos, por haber sido mi Director, por haberme enseñado a pensar, por haberme rescatado de la desilusión de la Ciencia, por haber permitido mi crecimiento, por haber tenido tanta paciencia a lo largo de los años, por haber fomentado en mí el espíritu crítico, por haber sido no solo un Director, sino también un amigo.
- a María Cristina Maggese y Graciela Guerrero por haber hecho posible que conociera al Dr. Lantos.
- a Andrea y Fabián, por que me "obligaron" a definir esta etapa de mi vida que por insatisfacción nunca terminaba y por haber "soportado" mi carácter mas allá de lo necesario.
- a Edu Cozza, por haber colaborado incansablemente en muchos de los trabajos que he realizado.
- a Claudio Lazzari, por haber sido y ser, UN GRAN AMIGO.
- a Tere por su paciencia frente a las interminables conferencias telefónicas.
- a Beba, por haber colaborado técnicamente en muchos de los experimentos de esta tesis.
- a Silvia Billi por haberme preguntado tantas veces.
- a Elsa Meinardi, por haberme escuchado y aconsejado incansablemente.
- a Adalí y a Guiye Burgos, por que me soportaron antes que Andrea y Fabián.
- a Guille Vicent por haber hecho mas alegres las horas en el laboratorio.
- a Marito (alias Lucas), Damián y Laura por haber compartido tantos momentos.
- a la Gonzalez, por que es UNA AMIGA.
- al Dr. Cedric Shackleton, por haberme ayudado con los espectros de masa.
- al Dr. Eduardo Gros, por sus primeras y acertadas sugerencias.
- al Dr. Marcel Hamik, por el analogo de aldosterona.
- al Dr. Robert Neher, por la 19-hidroxicorticosterona.
- y a todos aquellos que, por haberme acompañado, hicieron que las horas fueran mas gratas.

Indice



INDICE

1. INTRODUCCION	pg
➤ Generalidades	1
➤ Anatomía e histología de la glándula interrenal	2
➤ Adaptaciones de los poiquiloterms a la temperatura	5
➤ Adaptaciones metabólicas a los cambios de temperatura	6
➤ Relaciones entre el pH intra y extracelular y la temperatura	7
➤ Adaptaciones lipídicas a los cambios de temperatura	9
➤ Efecto de la temperatura sobre actividades enzimáticas distintas de las mencionadas	12
➤ Biosíntesis de esteroides	13
➤ Biosíntesis de esteroides interrenales en anfibios anuros y su regulación	20
➤ Biosíntesis de esteroides en <i>Rana catesbeiana</i>	20
➤ Regulación de la biosíntesis de esteroides en <i>Rana catesbeiana</i>	23
➤ Regulación de la biosíntesis de esteroides en <i>Rana ridibunda</i>	24
➤ Biosíntesis de esteroides en <i>Bufo arenarum</i>	26
➤ Otras especies estudiadas	27
➤ Caminos biosintéticos propuestos	28
➤ Ultimos pasos de la síntesis de aldosterona	30
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
➤ Animales	35
➤ Aclimatación de los animales a distintas salinidades	35
➤ Obtención preparación y tratamiento del tejido	35
➤ Interrenales de sapo	35
➤ Adrenales de rata	36
➤ Adrenales de pollo	37
➤ Obtención de muestras de sangre	37
➤ Soluciones buffer	37
➤ Condiciones de las incubaciones	38

➤ Disolución de los precursores	38
➤ Temperaturas de incubación	38
➤ Extracción de los esteroides formados	39
➤ Caracterización y cuantificación de los productos formados	39
➤ Estudios de espectrometría de masa–cromatografía gaseosa	43
➤ Biosíntesis y purificación del compuesto "N"	44
➤ Derivatización	44
➤ Determinación de contenidos endógenos	44
➤ Preparación de las muestras	45
➤ Tiempo de retención del compuesto "N" y 5-HAA	46
➤ Tiempos de retención de corticosterona, 18-hidroxycorticosterona y aldosterona	46
➤ Estudios de biosíntesis de aldosterona	47
➤ Capacidad precursora de aldosterona de 18-hidroxycorticosterona (18OHB "M" y "L")	47
➤ Capacidad precursora de aldosterona del compuesto "N"	47
➤ Requerimiento de cofactores de la transformación de "N" en aldosterona	48
➤ Efecto de cianocetona (CNK) sobre la transformación de "N" en aldosterona	48
➤ Experimentos de incubación de "N" con la enzima 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa	48
➤ Fraccionamiento subcelular	49
➤ Preparación de fracciones submitocondriales	52
➤ Determinación de la actividad de enzimas marcadoras	52
➤ Medición de la actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa (3βHSD/I)	53
➤ Localización subcelular de la actividad de 3βHSD/I	55
➤ Requerimiento de cofactores de la actividad de 3βHSD/I	55
➤ Estudios de inhibición de la actividad de 3βHSD/I	55
➤ Cálculo de las constantes cinéticas de la enzima 3βHSD/I	55
➤ Radioinmunoanálisis	56
➤ Medición de la radiactividad	57
➤ Tratamiento estadístico de los resultados.	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
➤ Biosíntesis de aldosterona	59

➤ Características químicas de la 18-OH-B de sapo	61
➤ Tratamiento en medio ácido	61
➤ Estudios de reversión	62
➤ Propiedades biosintéticas de 18-OH-B	62
➤ Propiedades cromatográficas de "N"	65
➤ Movilidades absolutas y relativas del compuesto "N" en distintos sistemas cromatográficos.	65
➤ Compuesto "N" y 19-hidroxicorticosterona (19-OH-B)	66
➤ Propiedades químicas del compuesto "N".	66
➤ Tratamiento en medio ácido.	66
➤ Tratamiento en medio alcalino.	67
➤ Saponificación	67
➤ Acetilación del compuesto "N"	68
➤ Propiedades biosintéticas del compuesto "N"	69
➤ Incubación del compuesto "N" con la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa comercial	71
➤ Requerimiento de cofactores para la conversión de "N" en aldosterona	74
➤ Efecto del agregado de cianocetona (cnk) sobre la transformación de "N" en aldosterona	75
➤ Efecto del agregado de cantidades crecientes del 3β-hidroxi-5-ene análogo de aldosterona sobre la transformación "N" en aldosterona.	77
➤ Cromatografía gaseosa y espectrometría de masa del compuesto "N".	80
➤ Actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ4 isomerasa en interrenales de sapo	89
➤ Actividad de 3βHSD/I en interrenales provenientes de animales recolectados en primavera-verano.	90
➤ Efecto de la aclimatación a distintas salinidades sobre la síntesis y secreción de aldosterona	100
➤ Efecto de la aclimatación a distintas salinidades sobre la actividad de la enzima 3βHSD/I	103
4. CONCLUSIONES	106
5. BIBLIOGRAFÍA	115

Introducción

.....

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Las hormonas esteroides pertenecen a un grupo de compuestos lipídicos cercanamente emparentados que son secretados por varios órganos endocrinos. Las glándulas esteroideogénicas más importantes de los vertebrados son: la glándula interrenal (corteza adrenal en mamíferos), las gónadas y la placenta de mamíferos. La importancia biológica de las hormonas producidas por estas glándulas radica en que unas son esenciales para la existencia del individuo (glándulas adrenales/interrenales) mientras que otras son fundamentales para la conservación de la especie (gónadas).

La glándula adrenal y sus homólogos son glándulas compuestas con diversas funciones. Una parte de su estructura, la médula adrenal o tejido cromafín (originado a partir de las células de la cresta neural), es la responsable de la producción y liberación de catecolaminas, mientras que la corteza adrenal o tejido cortical (de origen mesodérmico) sintetiza y secreta hormonas esteroideas (Chester-Jones, 1957) (Ver más adelante).

Es bien sabido que la glándula interrenal y sus homólogos en vertebrados superiores constituyen el órgano de adaptación por excelencia. En estos últimos, la corteza adrenal produce hormonas de función tan variada como respuesta al stress y a sus consecuencias nocivas (glucocorticoides), economía de electrolitos (mineralocorticoides), homeostasis ácido-base y también funciones sexuales, progestágenas, etc. Todas estas hormonas no sólo tienen un origen biosintético común a partir del colesterol, sino que son frecuentemente interconvertibles: que una hormona sea al mismo tiempo tal y precursora de otra de diferente función biológica es un hecho bastante general en esta glándula, y en otras tales como el ovario, y la regulación de los pasos biosintéticos depende tanto de requerimientos homeostáticos como de mecanismos moleculares sumamente delicados y de gran variabilidad. Todos estos procesos han sido extensiva aunque no exhaustivamente estudiados en mamíferos; sin embargo la cantidad de información con que se cuenta en otros grupos de vertebrados es limitada en grado sumo.

Hemos planteado hasta aquí la existencia de una glándula con una importante función adaptativa. ¿Qué sucede con una glándula típicamente adaptativa en aquellos organismos que por sus características carecen de la capacidad de regular su temperatura corporal, tales como

los poiquilotermos?.

No cabe duda que estos grupos son adecuados para estudiar la influencia de factores de variabilidad ambiental tales como la temperatura, humedad, fotoperíodo, etc. Si una especie es capaz de sobrevivir en un amplio rango de temperaturas debe, por fuerza, poseer adaptaciones bioquímicas y fisiológicas que le permitan mantener sus funciones vitales a un nivel relativamente constante frente a los cambios externos. Por consiguiente sería lógico pensar que la glándula interrenal de los poiquilotermos, por ser una glándula de adaptación, podría llegar a tener una actividad diferencial en función de las variables ambientales, entre ellas naturalmente la temperatura.

Como sabemos, los anfibios pertenecen al grupo de animales poiquilotermos y tal vez sea el grupo que esté expuesto, según las especies y su distribución, a las oscilaciones más amplias de temperatura, tanto estacionales como diarias. Tomemos por ejemplo *Bufo arenarum* H; esta especie de bufónido sudamericano es de gran abundancia y amplia distribución dentro de nuestro país, de tal manera que su habitat abarca zonas y temporadas desde el clima tropical hasta temperaturas cercanas a 0°C. Los estudios de Gallardo (Gallardo, 1962), indican que se extiende desde Bolivia (Departamento de Cochabamba) hasta la provincia Argentina de Chubut y desde el estado brasileño de Río Grande do Sul hasta la Cordillera de los Andes.

Si bien *Bufo arenarum* H. tiene entre nosotros una vieja y tradicional historia como modelo para los estudios endocrinos (Houssay y Di Benedetto, 1932; Lascano-Gonzalez, 1935; Gerschenfeld y col., 1960), ha sido poco estudiado desde el punto de vista de su corticoidogénesis.

ANATOMIA E HISTOLOGIA DE LA GLANDULA INTERRENAL.

En anfibios anuros en general (Chester-Jones, 1957) y en *Bufo arenarum* H en particular (Fustinoni y Porto, 1938), las glándulas interrenales se hallan situadas en la cara ventral del riñón mesonéfrico al que se adhieren íntimamente sin hacer saliencia sobre el parénquima renal y en estrecha relación con las venas colectoras de aquella cara. Tienen un aspecto acintado y un color amarillo intenso. La glándula está constituida por trabéculas celulares anastomosadas entre las cuáles se hallan los sinusoides venosos que desembocan en una vena central de gran calibre, que se dispone a todo lo largo de la glándula y el parénquima renal, siendo posible ver en la zona límite cordones glandulares que invaden el parénquima. Los estudios de

ultraestructura microscópica muestran que los cordones trabeculares se hallan constituidos por dos tipos celulares diferenciados, las células corticales y las células cromafines (Piezzi y Burgos, 1968). Otros anfibios anuros poseen un tercer tipo de células, las células de verano o de Stilling (Chester-Jones, 1957), que no se encuentran presentes en esta especie (Piezzi y Burgos, 1968). El tipo cortical es el más abundante y es el que puede ser comparado con las células cortico-adrenales de mamíferos.

Numerosos estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos han establecido una zonación funcional de la adrenal de mamíferos. En primera instancia, se pueden definir dos grandes zonas, constituidas por tejidos que poseen un origen embriológico distinto y que producen hormonas de naturaleza química distinta: 1) el tejido cortical, productor de esteroides, originado a partir del epitelio celómico en el extremo craneal del riñón y 2) la médula adrenal, productora de catecolaminas y derivada de las células de la cresta neural.

En la corteza adrenal pueden distinguirse tres zonas que difieren en su morfología así como en el tipo de esteroide que producen. La zona glomerulosa, sintetiza y secreta aldosterona, la zona fasciculata sintetiza y secreta glucocorticoides mientras que la zona reticular produce tanto glucocorticoides como andrógenos. En estudios más recientes se ha determinado que en el cortex adrenal pueden encontrarse también células cromafines. La presencia de estas células se ha establecido tanto para la zona glomerulosa como fasciculata (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). Utilizando técnicas de inmunohistoquímica se han detectado células cromafines que parecen radiar desde la médula adrenal hasta la zona glomerulosa (Palacios y Lafraga, 1975; Gallo-Payet y col., 1987; Bornstein y col., 1991) así como islotes de células cromafines en íntimo contacto con células corticales. (Bornstein y col., 1994; Berka y col., 1996).

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, la glándula interrenal de anfibios no presenta ningún tipo de zonación morfológica evidente aunque parecería que dentro de las células corticales podrían diferenciarse dos tipos celulares que se ponen de manifiesto en *Rana catesbeiana* después de la hipofisectomía (Varma, 1977):

- células en estado de regresión, caracterizadas por una disminución en el retículo endoplásmico y la presencia de gotas lipídicas coalescentes
- células activas, con abundante retículo endoplásmico liso y gotas lipídicas individuales.

Por otra parte, cuando los animales son mantenidos en agua destilada (aumento en la

pérdida de sodio y aumento en la secreción de aldosterona, ver más adelante) muchas de sus células corticales, aunque no todas, presentan gran número de mitocondrias cuyas crestas tienen aspecto lamelar. En la rata, las mitocondrias con crestas lamelares son características de las células de la zona glomerulosa, productoras de aldosterona, mientras que las células de las zonas fasciculata-reticularis, que producen glucocorticoides y andrógenos, presentan mitocondrias con crestas de aspecto vesicular (Sabatini y De Robertis, 1961). En *Rana catesbeiana*, en todas las condiciones experimentales que conducen a un aumento en la pérdida de sodio, se hacen evidentes dos tipos celulares corticales, células con mitocondrias de crestas lamelares y células con mitocondrias con crestas vesiculares. Si se estableciera una homología con lo descrito para adrenal de rata, estos dos tipos celulares podrían corresponder a células productoras de mineralo y glucocorticoides. Ahora bien, las células con mitocondrias lamelares no pueden describirse como una constante en el tejido interrenal, sólo se hacen evidentes en condiciones en las cuales se requiere un aumento en los niveles de aldosterona. Estos resultados dejan abierta la duda de si realmente se trata de dos tipos celulares diferentes o bien de dos estados fisiológicos diferentes del mismo tipo celular.

Se han llevado a cabo también estudios comparativos de la histología de la glándula de *Bufo arenarum* entre ejemplares obtenidos en invierno y en verano (Piezzi y Burgos, 1968). Estos estudios indicarían la existencia de cambios morfológicos estacionales en las células corticales. Estas variaciones comprenden el volumen total de la glándula, depósito de lípidos y colesterol, y la actividad, medida por métodos histoquímicos, de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ 4 isomerasa, enzima cuyo papel en la esteroidogénesis es bien conocido. Los estudios mencionados (Piezzi y Burgos, 1968) indicarían una baja actividad secretoria en las interrenales provenientes de animales de invierno. Sin embargo es interesante hacer notar que en *Rana catesbeiana* (Piper y de Roos, 1967) se encontraron resultados opuestos según los cuales la actividad secretoria de la glándula (secreción de corticosterona) alcanzaría un máximo entre el comienzo y el fin del invierno, indicando, o bien diferencias específicas de especie, o bien cambios funcionales sin concomitantes cambios morfológicos. Estos resultados son coincidentes con los hallados en los estudios de biosíntesis realizados en *Bufo arenarum* (Ceballos y col., 1983 y 1992). En éstos se encontró que la biosíntesis de esteroides presenta marcadas diferencias estacionales que no correlacionan con los estudios morfológicos de Piezzi y Burgos (Piezzi y Burgos, 1968). Los animales de invierno sintetizan activamente corticosterona (Ceballos y col, 1992) tal cual lo descrito para *R. catesbeiana*, mientras que los

animales de primavera-verano biosintetizan fundamentalmente aldosterona (Ceballos y *col.*, 1983).

ADAPTACIONES DE LOS POIQUILOTERMOS A LA TEMPERATURA.

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan la supervivencia y la eficiencia de los organismos con relación a su medio. A lo largo de sus actividades diarias, los individuos pueden enfrentarse a un amplio rango de condiciones térmicas, ya que aquéllas se llevan a cabo en un ambiente térmicamente heterogéneo. Los animales terrestres se ven afectados por factores tales como la intensidad de calor provocada por el sol, el grado de conducción de los sustratos, la evaporación de agua, las corrientes de convección, etc., que pueden influir en la temperatura corporal. En los organismos acuáticos, algunas especies pueden experimentar condiciones térmicas extremas (peces antárticos) aunque estables, o bien pueden estar sometidos a temperaturas variables a lo largo de su migración diaria en sentido vertical o su migración estacional (formas migratorias marinas o dulceacuícolas).

Si bien los animales homeotermos pueden mantener la constancia de su temperatura corporal a través de una serie de procesos dependientes de energía, los poiquilotermos son generalmente más afectados por las temperaturas del medio, aún cuando ejercen cierto control sobre su temperatura corporal a través de pautas de comportamiento. Cuando la regulación térmica a través del comportamiento es posible, se produce en general la tendencia a estabilizar la temperatura corporal alrededor de alguna temperatura "preferida".

En los anfibios, esta estabilización de la temperatura parece tener lugar a través de determinados comportamientos que incluyen las típicas posiciones de "asoleado" para aumentar la toma de calor a partir de la radiación solar, el retardo en la pérdida de calor mediante la actitud de enterrarse a varios centímetros bajo tierra o de sumergirse en el agua y perder calor por evaporación dorsal, absorbiendo agua paralelamente por la piel ventral (Brattstrom, 1960; Lillywhite, 1970; Lillywhite y Licht, P. 1975). Sin embargo, fuera de estos mecanismos comportamentales, los anfibios en general y los anuros en particular carecen de capacidad termorreguladora según puede desprenderse de los trabajos realizados por Brattstrom, sobre un número importante de especies, tanto en el campo como en el laboratorio (Brattstrom, 1963; 1968; 1970; 1979). Trabajando en el campo sobre 5 especies de leptodactílicos, 17 de bufónidos, 14 de hílidos y 12 de ránidos del norte de América, Brattstrom (Brattstrom, 1963) obtuvo una serie de resultados que permiten concluir que entre las especies

estudiadas por él:

- Pueden encontrarse anfibios anuros con temperaturas corporales que oscilan entre 3°C y 36°C.
- Hay diferencias específicas, genéricas y de familia con respecto a la tolerancia térmica y las preferencias.
- Algunas especies tienen un amplio rango de tolerancia mientras que en otras éste es muy acotado.
- No hay evidencias que sugieran que estas especies cuenten con un mecanismo para regular su temperatura corporal que no sea a través del comportamiento.
- La temperatura de los individuos difiere en sólo unos pocos grados con respecto a la del ambiente.

Resultados similares se obtuvieron estudiando la aclimatación en función de la altitud (Brattstrom, 1968), en anfibios anuros australianos (Brattstrom, 1970) y en estudios de laboratorio (Brattstrom, 1979).

En Sud América en general, y en la Argentina en particular, no se han realizado estudios sistemáticos como los mencionados hasta aquí. Sin embargo, a pesar de que nada se conoce respecto a las tolerancias y preferencias térmicas de las especies sudamericanas, podría suponerse, en primera aproximación, que los resultados serían similares a los obtenidos para las especies del norte de América.

ADAPTACIONES METABOLICAS A CAMBIOS DE TEMPERATURA

Hazel y Prosser (Hazel y Prosser, 1974) han sugerido que las alteraciones del metabolismo en compensación a los cambios de temperatura se deben fundamentalmente a cuatro procesos:

1. Cambios cuantitativos en la síntesis de enzimas o isoenzimas.
2. Síntesis de isoenzimas específicas de temperatura.
3. Cambios inducidos por la temperatura en el ambiente intracelular y extracelular que afectan la actividad catalítica.

4. Cambios conformacionales en las enzimas unidas a membrana, provocados por cambios en la composición lipídica de la bicapa.

Los estudios acerca de estas adaptaciones en poiquilotermos, si bien incompletos especialmente en cuanto a anfibios se refiere, permiten asignar importancia selectiva a las dos últimas categorías. Es así como en el tercer grupo se destacan en poiquilotermos las relaciones entre el pH intracelular y la temperatura, relaciones que aparecen como diferenciales si se las compara con las existentes en vertebrados superiores (ver más adelante). En el cuarto grupo, es evidente la importancia que poseen en organismos que solo controlan imperfectamente su temperatura interna, las alteraciones en la saturación de los lípidos de membrana - determinantes de su fluidez - como respuesta a cambios frío-calor.

RELACIONES ENTRE EL pH INTRA Y EXTRACELULAR Y LA TEMPERATURA.

Consideremos ahora el pH del medio interno, y el intracelular, que pueden ser, por un lado, marcadamente modificados por los cambios de temperatura y por el otro responsables de las respuestas adaptativas a dichos cambios.

Para empezar a entender las complejas relaciones entre pH y temperatura en poiquilotermos quizás lo mejor sería que tengamos en cuenta lo siguiente:

El pH sanguíneo de un poiquilotermo varía en función de la temperatura corporal como ha sido ampliamente descrito para varias especies de ofidios (White y Somero, 1982), anfibios y tortugas (Howell, 1970). Las mediciones de pH realizadas *in vivo* entre 5°C y 37°C muestran variaciones del orden de -0.016 unidades de pH/°C, mientras que la presión parcial de CO₂ aumenta conjuntamente con la temperatura (White y Somero, 1982; Howell, 1970).

Cuando se mantiene *in vitro* la sangre de estos vertebrados en un sistema cerrado a los gases atmosféricos, aquella posee también una relación pH/temperatura de aproximadamente -0.015 unidades de pH/°C. Este hecho es sumamente sorprendente ya que si bien un organismo poiquilotermo no es un sistema cerrado incapaz de interactuar con el medio ambiente, los valores obtenidos en los experimentos *in vivo* e *in vitro* se asemejan (Reeves, 1977).

La relación pH/temperatura antes mencionada ha sido detenidamente estudiada por Reeves (Reeves, 1976) quien postuló que la pendiente de la mencionada función equivale a la que exhibe la mezcla de dos sistemas buffer muy importante como el sistema bicarbonato-ácido

carbónico y los sistemas histidina en el rango de proporciones en las que estos interaccionan en la sangre de dichos poiquilotermos. Experimentalmente, puede obtenerse una relación pH/temperatura de -0.015 unidades/ $^{\circ}\text{C}$ en una solución acuosa de buffer bicarbonato que contenga grupos imidazólicos cuando se mantiene esta solución con un contenido constante de CO_2 (Wilson, 1977). En sistemas fisiológicos que contienen proteínas el grupo determinante del pH es el imidazólico de las histidinas. El pK del grupo imidazol de las proteínas fluctúa ampliamente con la temperatura (-0.017 U/ $^{\circ}\text{C}$) y es este cambio el que controla las variaciones de pH que se producen en la solución cuando se modifica aquella. Por otra parte, el cambio de pH resultante de la modificación de las constantes de disociación del imidazol afecta también el equilibrio bicarbonato-ácido carbónico. Sobre éste, la temperatura actúa asimismo de otra manera: disminuye la solubilidad del CO_2 .

La mayor parte de los grupos titulables de las proteínas en un rango de pH fisiológico son, en efecto, los residuos de histidina, con una pequeña contribución de los grupos α amino-N terminal. En un rango de pH entre 6 y 8, la carga neta de las proteínas está relacionada con la fracción de los grupos imidazólicos (αIM) que se encuentra disociada, esto es, que ha perdido su carga positiva. Esto significa que pequeñas alteraciones en el pH fisiológico provocarían cambios en la carga de las histidinas que podrían modificar la conformación de una proteína y, consecuentemente, su actividad biológica. La fracción de grupos αIM disociados aumenta en función del incremento de pH para una dada temperatura (White y Somero, 1982). Sin embargo, cuando comparamos los valores de αIM para distintas temperaturas con sus pHs correspondientes, la fracción de grupos disociados se mantiene prácticamente constante, por lo menos para la sangre de *Rana* (Wilson, 1977). Estos resultados indicarían que la disociación de los residuos de histidina, así como la carga de las proteínas, están "protegidas" frente a variaciones en la temperatura corporal y en la pCO_2 . El organismo de la rana compensa pH con temperatura para mantener esta constancia de manera de preservar funciones importantes de las proteínas tales como la habilidad de unir ligandos, su actividad catalítica, etc. (Reeves, 1972; Reeves, 1977; Malan y col., 1976). Este patrón de control en poiquilotermos se denomina regulación "alfa-stat", en contraste con el sistema que prevalece en homeotermos, que regula su estado ácido-base a través de la constancia del pH (regulación "pH-stat"). El término "alfa-stat" implica que, por lo menos para los poiquilotermos, lo biológicamente importante es el equilibrio de cargas óptimo antes que el pH óptimo (Reeves, 1976). Sin embargo, a pesar de las estrategias diferenciales desarrolladas por ambos grupos en cuanto al mantenimiento de este

equilibrio de cargas, la sangre arterial de la mayoría de los vertebrados no homeotermos, a 37°C, tiene también un pH cercano a 7,4, el valor hallado para mamíferos. Sin embargo el rango de pH en que puede fluctuar la sangre de un mamífero es mucho más acotado que en un poiquiloterma. Cualquier desviación (mayor que 7,6 o menor que 7,2) de este "pH correcto" en un mamífero acarrea consecuencias irreversibles; la sangre de un poiquiloterma puede oscilar entre valores más amplios (con diferencias en los extremos de aproximadamente una unidad de pH), sin que ello signifique consecuencias negativas para la especie.

Veamos algunos ejemplos del papel que juegan los grupos α -imidazólicos en las estrategias de regulación. Es bien sabido que en el caso de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) los grupos histidina están involucrados en la unión con el sustrato. El piruvato sólo puede unirse a la enzima si los grupos imidazólicos de la histidina se hallan protonados. A partir de esto se analizó el efecto de las variaciones de pH y de temperatura sobre la unión del piruvato (Yancey y Somero, 1978). Cuando el pH se mantiene constante, la K_m del piruvato varía ampliamente con la temperatura, mientras que cuando se permite que el pH varíe en función de la temperatura, entonces la K_m se mantiene aproximadamente constante. De estos estudios con LDH puede concluirse que la variación del pH con la temperatura permite la estabilización de los grupos α -imidazólicos y, consecuentemente, la conservación de los valores de K_m (Yancey y Somero, 1978).

Hay varios otros ejemplos en los cuales se demuestra la importancia de las variaciones de pH para mantener las funciones celulares. En el caso de la ATPasa Na^+/K^+ dependiente obtenida a partir de la piel de sapo, pudo observarse (White y Somero, 1982) que, cuanto menor es la temperatura, más alcalino es el pH óptimo de la enzima. La inversa también es cierta. Otras enzimas que parecen responder al mismo esquema son: acetil-CoA carboxilasa, NADH-citocromo c reductasa y succinato-citocromo c reductasa (Hazel y *col.*, 1978).

Surge de lo expuesto hasta aquí la importancia de los mecanismos adaptativos de los poiquilotermos para compensar los cambios de temperatura a los que están expuestos a través de la interacción temperatura-pH; y la necesidad de mantener la conformación y función de las proteínas mediante la constancia en la carga neta a diferentes temperaturas.

ADAPTACIONES LIPÍDICAS A LOS CAMBIOS DE TEMPERATURA.

Un segundo sistema fisiológico-bioquímico involucrado en la regulación térmica se

encuentra en la composición lipídica de las membranas celulares.

La bicapa lipídica de las membranas biológicas puede presentarse tanto en estado sólido como líquido. La transición de uno a otro estado se produce cuando la temperatura supera la temperatura de fusión de los lípidos, obviamente relacionado con la naturaleza y cantidad de las cadenas alifáticas. En condiciones fisiológicas la bicapa lipídica se mantiene en estado líquido (llamado también estado líquido-cristalino). Este estado confiere a las membranas la propiedad de ser fluidas y por consiguiente la capacidad de llevar a cabo las distintas funciones biológicas de una célula viva.

Desde un punto de vista físico, el estado sólido es un estado altamente ordenado en el cual todos los enlaces C–C tienen conformación *trans*, mientras que en el estado líquido (fluido) hay mayor libertad o desorden. Para alcanzarlo es necesario disminuir la interacción hidrofóbica entre las cadenas de los ácidos grasos. Es fácil deducir, entonces, que el orden será mayor en una bicapa de fosfolípidos con ácidos grasos saturados de cadena larga que en una con ácidos grasos insaturados. En efecto, la presencia de un doble enlace *cis* produce, en estos últimos, un "codo" en la cadena hidrocarbonada que interfiere con el empaquetamiento ordenado, a la vez que provoca un acortamiento de la proyección de las cadenas. Estos cambios traen como consecuencia una disminución de la temperatura de fusión de la bicapa. Por otra parte, si se agrega colesterol a una bicapa de fosfolípidos, el esteroles se acomoda con el grupo alcohólico orientado hacia las cabezas polares de los fosfolípidos y los anillos con las porciones de las cadenas alifáticas cercanas a dichas cabezas, inmovilizándolas. De esta manera, el colesterol agrega orden a la bicapa, sin solidificarla, pues deja flexibles las zonas de las cadenas hidrocarbonadas cercanas al extremo no polar. Estos hechos permiten modular, adaptativamente, la fluidez de las membranas en compensación a los cambios de temperatura producidos en el medio ambiente. La capacidad biológica de llevar a cabo esta modulación se denomina *adaptación homeoviscosa* y ha sido extensivamente estudiada en *Escherichia coli* (Sinensky, 1974), en *Tetrahymena pyriforme* (Kasai y col., 1976) y en peces (Cossins y Prosser, 1978).

El término "*homeoviscosidad*" implica que la bicapa lipídica funciona en forma óptima cuando los lípidos están en estado líquido-cristalino (ver arriba) y que este estado puede conservarse homeostáticamente cuando se producen cambios de temperatura, mediante las modificaciones de y en sus ácidos grasos arriba descritas. Un ejemplo de lo expuesto hasta

aquí puede encontrarse en los estudios de Cossins y Proser (Cossins y Prosser, 1978) quienes, trabajando con vesículas sinaptosomales de peces aclimatados a distintas temperaturas, encontraron cambios lipídicos que contribuirían a la adaptación homeoviscosa. Los autores hallaron que, particularmente para los fosfoglicéridos de colina, estas especies responden selectiva y adaptativamente a la disminución de la temperatura con la inducción de las desaturasas. Como consecuencia de la mencionada inducción se produce un aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos. De esta forma, la disminución en la saturación de los lípidos que se produce frente a una disminución de la temperatura contribuye a mantener el estado líquido-cristalino.

Además de aumentar la fluidez de las membranas celulares, la modificación del microambiente lipídico en el cual se encuentran inmersas las proteínas asociadas a aquéllas afecta la actividad de muchas enzimas. Esto ha sido estudiado para adenosina trifosfatasa Na⁺-K⁺ dependiente, en anguila (Thompson y *col.*, 1977), citocromo c oxidasa (Vic y Capaldi, 1977) y otras enzimas unidas a la membrana mitocondrial (Wodtke, 1976). Alteraciones en el grado de saturación de los fosfolípidos afectan sus velocidades de reacción. Por ejemplo, una disminución en el grado de saturación que se produce como parte de un mecanismo adaptativo frente a un descenso de la temperatura, provoca un aumento en la actividad específica de la citocromo c oxidasa y una modificación en la dependencia que tiene esta actividad de la temperatura. Es precisamente en este caso que se produce lo que se denomina una "ruptura" en el gráfico de Arrhenius (log de la velocidad vs. la recíproca de la temperatura), el cual se modifica durante la aclimatación a la temperatura, probablemente como resultado de cambios en los fosfolípidos. Estas modificaciones en los fosfolípidos conducirían a variaciones en la temperatura de "solidificación" (o de fusión, ver más arriba) de las membranas cuando las anguilas se aclimatan a un nuevo ambiente térmico (Vic y Capaldi, 1977). A su vez este cambio en el estado de agregación de la membrana modifica las propiedades cinéticas de aquellas enzimas (Maggio, 1994).

Lamentablemente, hasta el momento no se cuenta con información concerniente al papel de la homeoviscosidad en anfibios, aunque podría pensarse que el grado de saturación de los fosfolípidos podría cumplir un rol semejante en este grupo de poiquilotermos.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE ACTIVIDADES ENZIMATICAS DISTINTAS DE LAS MENCIONADAS.

Como ya hemos discutido, la aclimatación a la temperatura está acompañada por una serie de cambios compensatorios en la mayor parte de los aspectos bioquímicos y fisiológicos de una especie (Maggio, 1994; Driedzic y Gesser, 1994; Crawshaw, 1979; Hazel y Prosser, 1974). Muchos de estos cambios pueden ser explicados, en parte, por variaciones en las actividades enzimáticas inducidas por cambios en la temperatura, no sólo en proteínas asociadas a membrana sino también en proteínas solubles.

Es así como numerosos autores encontraron que la aclimatación al frío está acompañada por un incremento en las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo energético, tales como las enzimas del Ciclo de Krebs y de la glicólisis. Los cambios observados dependen de la especie, del tejido analizado (Shacklee y *col.*, 1977) y muchas veces de la etapa del desarrollo en que se encuentre el organismo (De Costa y *col.*, 1979; 1981). En las enzimas no involucradas en el metabolismo energético o en la síntesis de proteínas los cambios compensatorios en función de la temperatura son menos conocidos (Hazel y Prosser, 1974; Nielsen y *col.*, 1977).

En otros mecanismos enzimáticos la temperatura altera la proporción relativa de isoenzimas. Un ejemplo típico, y de los más estudiados a este respecto, es otra vez el de la láctico deshidrogenasa (LDH). Esta enzima, como es sabido, cataliza la transformación reversible de piruvato a lactato, fundamental para la glicólisis y para la regulación de la relación $NAD^+/NADH$. Muchos tejidos de vertebrados poseen cinco isoenzimas correspondientes a LDH, que pueden ser separadas electroforéticamente y que son el producto de las diferentes combinaciones de dos subunidades: LDH1 (H4), LDH2 (H3M), LDH3 (H2M2), LDH4 (HM3) y LDH5 (M4). Las distintas funciones que cumplen las isoenzimas de LDH podrían ser explicados por la diferencia que presentan en cuanto a la inhibición por sustrato (Everse y Kaplan, 1975): LDH1 es inhibida por altas concentraciones de piruvato y lactato, mientras que LDH5 no posee tal característica. Estas diferencias podrían permitir que la LDH5 re-oxide NADH y entregue energía en condiciones de anaerobiosis. Algunos autores encontraron en peces (Tsukuda, 1975) y en anfibios (Tsugawa, 1976; 1980) que la actividad de ciertas isoenzimas, como la LDH4 y LDH5, está aumentada en los animales expuestos a bajas temperaturas, mientras que otros (Shacklee y *col.*, 1977), también trabajando en peces, no hallaron en este sentido diferencias

significativas.

Esta enumeración de categorías de adaptación metabólica, resumidas al principio de esta sección es forzosamente incompleta. No puede descartarse que puedan describirse, a raíz de investigaciones por venir, mecanismos adicionales de control por la temperatura.

Es de hacer notar, nuevamente, la falta de información más diversificada acerca de los efectos de la temperatura sobre distintas actividades enzimáticas fundamentales para el individuo cuando se modifica su temperatura corporal.

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES.

Las hormonas corticosteroideas se biosintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, que es captado de la circulación por las células córtico-adrenales como colesterol LDL o HDL, según la especie. Una vez incorporado a las células, a través de un mecanismo mediado por receptores, es transformado en pregnenolona. A partir de ésta surgen los caminos biosintéticos que conducen a los esteroides más oxidados, y biológicamente más activos, tales como cortisol o corticosterona, ambos glucocorticoides (Fig. 1), y el mineralocorticoide aldosterona (Fig. 2). Todos los caminos biosintéticos conocidos involucran reacciones oxidativas, entre las cuales cabe destacar las hidroxilaciones y las deshidrogenaciones. Algunos esteroides sufren también reacciones reductivas, como las que conducen a la formación de derivados reducidos en el anillo A y en la posición C-20.

Como ya se ha mencionado, muchas hormonas esteroideas tienen la capacidad de ser hormonas propiamente dichas y comportarse como precursoras de otras de diferente función biológica. Este hecho lleva a una categorización en sí misma limitada pero que permite comprender un poco más dos términos que reflejan muy bien a las hormonas esteroideas, tales como "plasticidad" y "especialización". Las categorías serían:

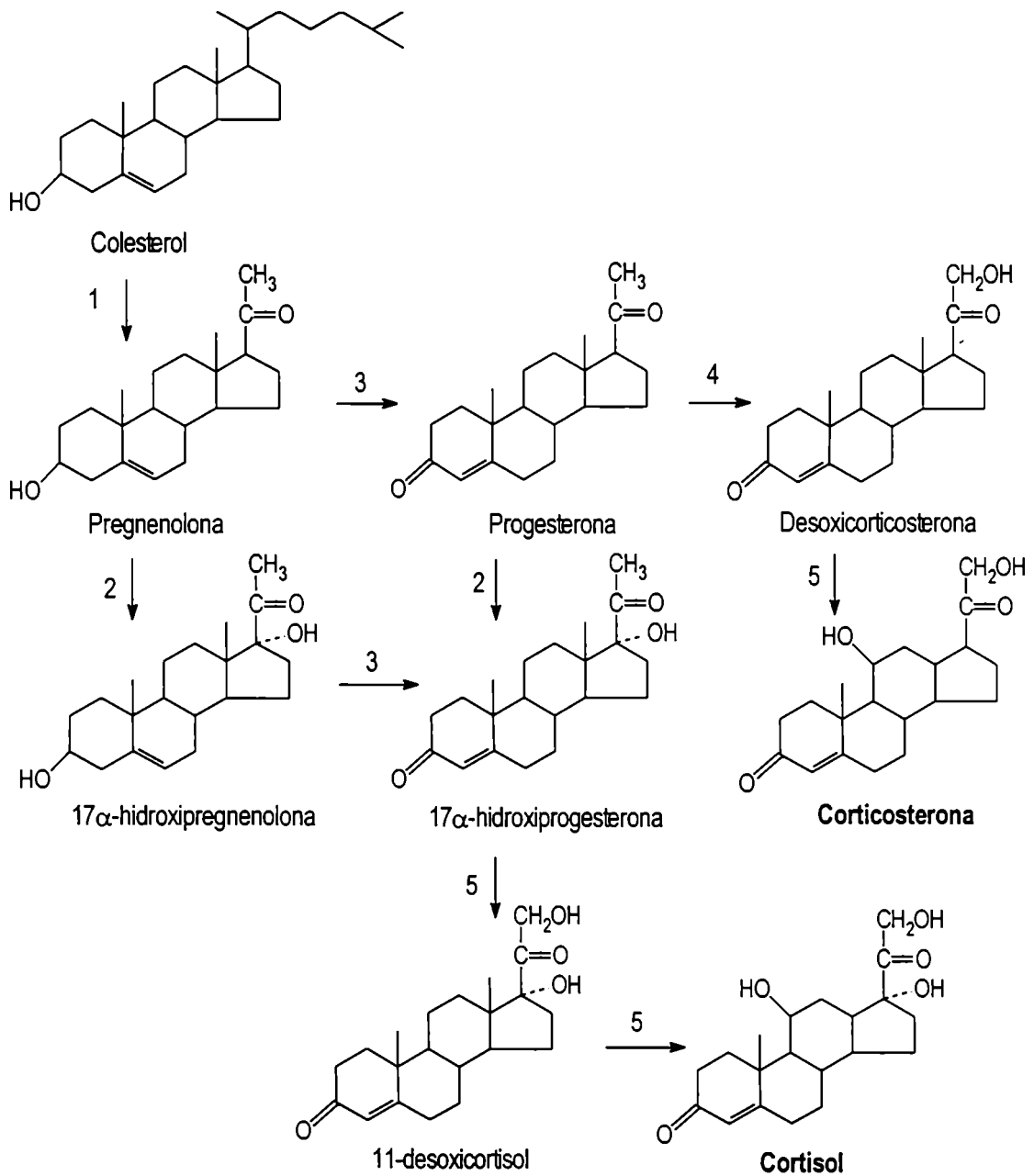
- Compuestos que son precursores y hormonas en sí mismos, tales como progesterona (progestágeno), corticosterona (glucocorticoide) y desoxicorticosterona (mineralocorticoide débil).
- Esteroides con exclusiva función hormonal, que se encuentran al final de un camino biosintético. Ej.: aldosterona (mineralocorticoide) y cortisol (glucocorticoide).
- Catabolitos "puros", productos de la metabolización de los compuestos antes mencionados.

Ej.: tetrahidroaldosterona, tetrahidrocortisol, 5α y 5β pregnanediona. Esta categoría se halla sujeta continuamente a evaluaciones críticas. Muchos de los productos considerados antes inactivos, han demostrado poseer importantes funciones a nivel del sistema nervioso central.

Que una hormona tenga la capacidad de comportarse como tal y pueda a su vez ser transformada en otra de mayor o distinta función biológica le concede la característica de plasticidad, mientras que los esteroides que se encuentran al final de los caminos biosintéticos son altamente especializados. Tomemos por ejemplo la relación desoxicorticosterona/aldosterona. Ambas tienen actividad mineralocorticoidea. Sin embargo aldosterona es cien veces más activa que desoxicorticosterona, solo bastan nmoles/litro de la primera para que se observe su acción sodio-retentora (Farnesil y Edelman, 1966).

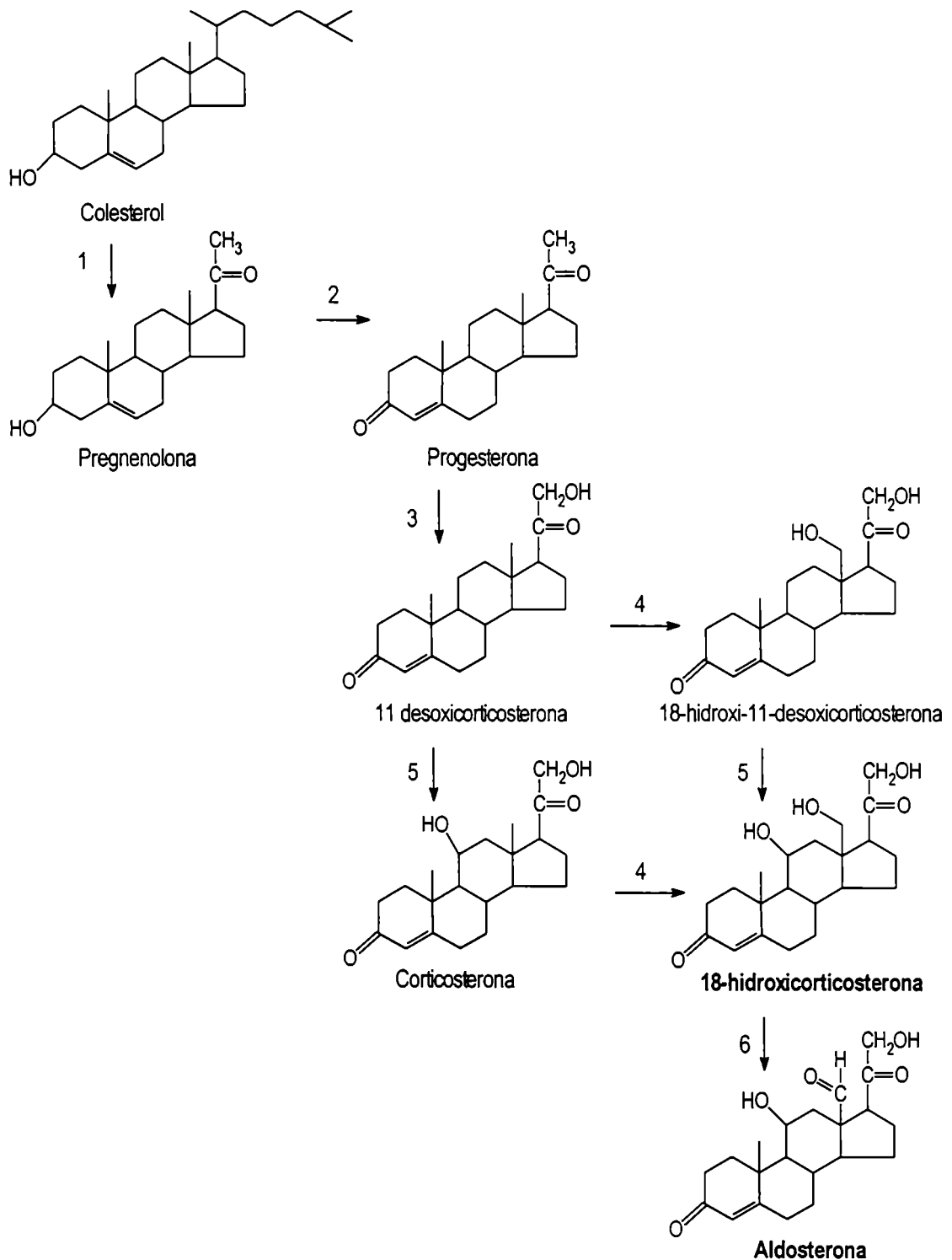
Con excepción de la transformación de pregnenolona a progesterona, de la cual hablaremos mas adelante, el avance a lo largo del camino biosintético se produce por una serie de hidroxilaciones sucesivas, las cuales involucran nucleótidos reducidos (NADPH) que se oxidan junto con el esteroide. Estas reacciones son *irreversibles*. Tal irreversibilidad se obtiene a través de una cadena oxidativa cuyo último eslabón es el citocromo P450, que utiliza oxígeno molecular y que conduce a la formación de esteroides cada vez mas oxidados. Estos poseen cada vez mayor potencia biológica, son menos plásticos y más especializados (Figs.1 y 2).

Figura 1. Caminos para la biosíntesis de glucocorticoides (cortisol y corticosterona).



Nota: 1: citocromo P450_{scc} ; 2: 17-hidroxilasa; 3: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa; 4: 21-hidroxilasa; 5: 11 β -hidroxilasa

Figura 2. Caminos para la biosíntesis de aldosterona.



Nota: 1: citocromo P450 scc; 2: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa; 3: 21-hidroxilasa; 4: 18-hidroxilasa; 5: 11 β -hidroxilasa; 6: aldosterona sintasa.

La conversión de pregnenolona a progesterona, la primera reacción que se produce después de la escisión de la cadena lateral de colesterol, es común a todos los caminos biosintéticos mostrados en las Figs. 1 y 2.

En forma general podría decirse que, en los tejidos esteroideogénicos de mamíferos, el pasaje de los 3 β -hidroxi-5-ene esteroides a 3-oxo-4-ene esteroides es un paso obligatorio en la biosíntesis de la mayoría de los esteroides biológicamente activos (glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, progestágenos y andrógenos). Esta transformación es necesaria tanto en las vías $\Delta 4$ como $\Delta 5$. La enzima que cataliza dicho paso es la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta 4$ isomerasa (3 β HSD/I) que se encuentra asociada a membranas intracelulares (Samuels y *col.*, 1951). Esta actividad es fundamental, entre otras, para la biosíntesis de:

- progesterona a partir de pregnenolona
- 17 α -hidroxiprogesterona a partir de 17 α -hidroxipregnenolona
- androstenediona a partir de dehidroepiandrosterona
- testosterona a partir de 4-androsten-3 β ,17 β -diol
- 5 α -dihidrotestosterona a partir de 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol

La reacción catalizada por la 3 β HSD/I involucra la deshidrogenación del hidroxilo C-3 y la posterior isomerización del doble enlace $\Delta 5$ a $\Delta 4$ (Ewald y *col.*, 1964). A diferencia de las hidroxilaciones, no requiere cofactores reducidos ni oxígeno molecular sino cofactores oxidados como el NAD⁺ (Edwards y *col.*, 1976; Ishii-Ohba y *col.*, 1986a y b).

Lo expuesto en el párrafo anterior indica que es posible diferenciar dos actividades distintas en la 3 β HSD/I, una de deshidrogenasa y otra de isomerasa (Ewald y *col.*, 1964). En *Pseudomonas testosteroni*, ambas actividades enzimáticas se hallan asociadas a dos proteínas distintas, una enzima tiene actividad de deshidrogenasa y la otra de isomerasa (Davidson and Talalay, 1966). Distintos son los resultados obtenidos en mamíferos. Todos los esfuerzos realizados con el objeto de separar físicamente ambas actividades han sido infructuosos. En adrenal, testículo, ovario y placenta todos los estudios bioquímicos realizados muestran que las reacciones de deshidrogenación e isomerización son llevadas a cabo por una única enzima (Ishii-Ohba y *col.*, 1986a y b; Yates y Deshpande, 1975; Thomas y *col.*, 1988; Genti Raimondi y

col., 1989; Thomas y col., 1989; Thomas y col., 1990; Takahashi y col., 1990; Lorence y col., 1990; Rheaume y col., 1991; Perry y col., 1991; Luu-The y col., 1991; Cherradi y col., 1992). Estos resultados fueron confirmados por el clonado y secuenciación del gen que codifica para la 3β HSD/I (Lachance y col., 1990; Dupont y col., 1992; Labrie y col., 1992; Clarke y col., 1993). Si bien se habla de una única proteína, con el uso de distintos inhibidores se ha logrado demostrar la presencia de dos sitios distintos en la misma enzima, uno para la deshidrogenación y otro para la isomerización (Thomas y col., 1988; Thomas y col., 1990; Luu-The y col., 1991; Cherradi y col., 1992; Dupont y col., 1992). La actividad de isomerasa requiere del NADH generado por la deshidrogenación, que actuaría como modulador alostérico (Ishii-Ohba y col., 1986a y b). La deshidrogenación es, al igual que en *Pseudomonas testosteroni*, el paso limitante de la velocidad de reacción y el carácter de irreversibilidad se obtiene como consecuencia de la posterior isomerización (Thomas y col., 1990; Luu-The y col., 1991). Se han logrado aislar los intermediarios 3-oxo-5-ene tanto en la transformación de pregnenolona a progesterona (Thomas y col., 1990; Ewald y col., 1964) como de dehidroepiandrosterona a androstenediona (Ishii-Ohba y col., 1986a y b).

Como ya se mencionara, en mamíferos, la 3β HSD/I se halla asociada a membranas, microsomales en adrenal y testículo de rata (Ishii-Ohba y col., 1986a y b; Yates y Deshpande, 1975) y mitocondriales y microsomales en placenta humana (Csapo, 1977; Thomas y col., 1988; Genti Raimondi y col., 1989; Thomas y col., 1989). En ésta, cataliza la producción de progesterona a partir de pregnenolona de origen materno y de androstenediona a partir de sulfato de dehidroepiandrosterona materno o fetal (Csapo, 1977). Recientemente Cherradi y col. (Cherradi y col., 1994) describieron para adrenal bovina la asociación, en membranas internas mitocondriales, de la 3β HSD/I con la enzima que escinde la cadena lateral de colesterol. Los autores sugirieron que ambas enzimas se hallarían formando un complejo supramolecular.

La actividad de 3β HSD/I, además de ser fundamental para la síntesis de la mayoría de los esteroides, podría estar involucrada en la transformación preferencial de precursores distintos en productos distintos. Hasta el momento existe un profundo debate acerca del número de isoformas de 3β HSD/I. Ciertas evidencias clínicas sugirieron la existencia de 2 isoformas en humanos (Cravioto y col., 1986) y dos en bovino (Ewald y col., 1964), formas que serían sustrato-específicas. Por estudios de clonado y secuenciación, se demostró la existencia de dos

genes para 3 β HSD/I en humanos, 4 en rata, 4 en ratón, 1 en mono y 1 en bovinos (Labrie y *col.*, 1992; Clark y *col.*, 1993). Los dos genes humanos dan origen a las isoformas I y II que poseen 95,4% de homología. El tipo I se expresa en placenta mientras que el II en adrenal, ovario y testículo. En el caso de la rata, los tipos I y II se expresarían en adrenal y gónadas mientras que el III lo hace en el hígado. Entre las formas I y II hay un 93,8% de homología y entre estas y la III un 85,7%. El tipo IV de rata, se expresa fundamentalmente en la placenta y la piel (Simard y *col.*, 1993). Sin embargo, a pesar de existir 4 genes distintos, las proteínas obtenidas luego de transfectar células HeLa con los distintos cDNA, si bien son activas, no poseen diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato (Labrie y *col.*, 1992). ¿Podría obtenerse especificidad de sustrato si las enzimas se localizaran en el entorno lipídico correspondiente? Esta pregunta aún carece de respuesta para esta enzima en particular (para otras ver Maggio, 1994). Podría ocurrir que la proteína purificada o los productos obtenidos por expresión génica en células transfectadas no representaran lo que ocurre en la realidad. Como ya mencionamos, las evidencias clínicas y los resultados obtenidos con fracciones subcelulares demuestran diferencias en cuanto a la preferencia de sustratos (Ewald y *col.*, 1964; Cravioto y *col.*, 1986).

Si bien, en la mayoría de los casos, el paso de isomerización del doble enlace de " Δ^5 " a " Δ^4 " para la biosíntesis de esteroides de 21 átomos de carbono, se produce predominantemente a la altura de los eslabones pregnenolona-progesterona, no se podría descartar isomerizaciones semejantes a lo largo de los caminos sintéticos que llevan a esteroides más oxidados o sea, como hemos visto, más especializados. De hecho en la biosíntesis del glucocorticoide especializado cortisol como, aún con mayor importancia cuantitativa, en la biosíntesis de andrógenos y estrógenos, se han encontrado compuestos tales como 11 β -hidroxipregnenolona, 21-hidroxipregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona y otros, a su vez buenos precursores de aquellas hormonas esteroides. Todo esto constituye una prueba experimental para isomerizaciones a niveles más oxidados, y por consiguiente de "vías Δ^5 " para llegar a aquellas hormonas. Como los intermediarios mencionados carecen, en su mayoría, de actividad biológica conocida esta vía podría significar una "ventaja" con respecto a la "vía Δ^4 ", en la cual muchos intermediarios son tales y hormonas a la vez. Estas vías alternativas adquirirían fundamental importancia en aquellas especies que poseen un único tipo celular responsable de la síntesis tanto de gluco como de mineralocorticoides.

Las adrenales de rata (Kraulis y Birmingham, 1964; Lantos y *col.*, 1967; Peron y McCarthy, 1968), las de aves (Pedemera y Lantos, 1973) y, en general (Sandor, 1969), las adrenales que no 17-hidroxilan o sólo lo hacen en pequeña medida carecen de una vía $\Delta 5$ importante. No se ha descrito, hasta la presentación de esta tesis, una vía $\Delta 5$ que lleve a aldosterona a pesar de la estructura altamente oxidada y el papel sumamente especializado de ésta, y por ende, de posibilidades y razones para que este mineralocorticoide se origine a través de tal camino biosintético.

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES EN ANFIBIOS ANUROS Y SU REGULACION

A pesar del número importante de especies que abarca cada una de las siete familias que componen el orden Anura, sólo once especies han sido estudiadas directa o indirectamente con relación a su glándula interrenal, todas ellas pertenecientes a sólo dos familias, ranidae y bufonidae. De esto se desprende que toda generalización con respecto a los mecanismos biosintéticos y regulatorios puede ser considerada muy aventurada.

Las primeras evidencias de la existencia de hormonas esteroides circulantes en anfibios se deben al grupo de trabajo del Dr. Chester-Jones (Phillips y Chester-Jones, 1957; Chester-Jones y *col.*, 1959) quienes aislaron cortisol tanto como corticosterona de los mismos efluentes de *Amphiuma tridactyla* (anfibio urodelo de la familia Amphiumidae). A partir de aquí, comenzaron los estudios esteroideogénicos propiamente dichos. A continuación se presentará un breve detalle de los conocimientos que se tienen de las especies más estudiadas.

Biosíntesis de esteroides en *Rana catesbeiana*

Esta especie ha sido intensamente estudiada a lo largo del tiempo y es, sin dejar lugar a dudas, la más conocida desde este punto de vista. Los primeros estudios biosintéticos *in vitro* fueron llevados a cabo por Carstensen y *col.* (Carstensen y *col.*, 1959, 1961) quienes, al incubar tejido interrenal entre 25°C y 28°C y a partir de precursores endógenos, encontraron que aldosterona y corticosterona eran, en ese orden, sus esteroides más abundantes. No pudieron detectar la presencia de cortisol por lo que supusieron, en primera aproximación, que la especie carecía de actividad 17 α -hidroxilásica. También pudieron establecer el efecto estimulante sobre la producción de aldosterona y corticosterona de la adrenocorticotrofina de mamífero (ACTH), hecho que ya había sido indirectamente establecido en experimentos en los cuales se observó, por acción de ACTH, un incremento en la producción del material que reaccionaba con sales de

tetrazolio desarrollando un color azul característico (Macchi, 1955). Esta reacción, característica de los corticoides, se produce por oxidación de la cadena α -cetónica, presente en éstos, y la reducción de sales de tetrazolio a compuestos de color azul o azul rosáceo.

En la misma época, se estableció la existencia de un tercer esteroide en esta especie, aislado a partir de incubaciones con progesterona-C¹⁴, esteroide que fuera caracterizado como 18-hidroxi-corticosterona (Ulick y Kusch, 1960).

Hasta ese momento se sabía que *R. catesbeiana* producía tres esteroides de todos los conocidos: aldosterona, corticosterona y 18-hidroxycorticosterona. Se conocía poco, sin embargo, acerca de los caminos biosintéticos que conducían a su síntesis. Algunos avances a ese respecto fueron realizados por el grupo del Dr. Ulick (Ulick y col., 1964; Nicolis y Ulick, 1965), quienes incubando progesterona-C¹⁴ con interrenales de la especie estudiada encontraron que a partir de aquella podían aislarse 18-hidroxycorticosterona y aldosterona, lo cual sugirió que progesterona podría ser un intermediario en su síntesis. Utilizaron también dos de los posibles intermediarios del camino biosintético Δ^4 , corticosterona y 18-hidroxycorticosterona. Al incubar cortes de interrenales a 26°C con 18-hidroxycorticosterona-H³, los autores observaron una importante, aunque variable, conversión de corticosterona a 18-hidroxycorticosterona y aldosterona y una transformación de 18-hidroxycorticosterona a aldosterona, muy pequeña (menor que 1%), pero significativa si se la compara con controles sin tejido interrenal. Estos resultados permitieron postular en esta especie una función de intermediario para la 18-hidroxycorticosterona en la biosíntesis de aldosterona. Sin embargo, no fue posible explicar satisfactoriamente su baja capacidad precursora de aldosterona (ver mas adelante).

Psychoyos y col. (1966) iniciaron el estudio de la localización subcelular de la transformación de corticosterona a aldosterona, analizando con posterioridad el requerimiento de cofactores de la transformación (Tallan y col., 1967) y la participación de un citocromo P450 en la síntesis de aldosterona (Greengard y col., 1967). La síntesis de aldosterona y de 18-hidroxycorticosterona se lleva a cabo en mitocondrias (Psychoyos y col., 1966) y requiere del agregado de NADPH y oxígeno molecular o bien de NADP⁺ y alguno de los intermediarios del ciclo de Krebs que puedan generar NADPH intramitocondrial (Tallan y col., 1967). La participación de citocromos P450 en la transformación de corticosterona a aldosterona quedó demostrada por lo siguiente:

➤ la presencia de citocromos P450 intramitocondriales que fuera determinada por métodos

espectrofotométricos

- inhibición de la síntesis de aldosterona por monóxido de carbono
- reversión de la inhibición por acción de la luz, a longitudes de onda entre 412 y 524 nm, y
- el espectro de acción fotoquímica con un máximo a 450 nm (Greengard y col., 1967).

Todos estos resultados indicarían que en la transformación de corticosterona en aldosterona se producen una o más hidroxilaciones, sugiriendo como posible intermediario entre ambos, a 18-hidroxycorticosterona, tal cual parecería ocurrir en la rata (Müller, 1971). Sin embargo, los rendimientos de aldosterona son muy bajos cuando se utiliza aquel esteroide 18-hidroxilado como sustrato.

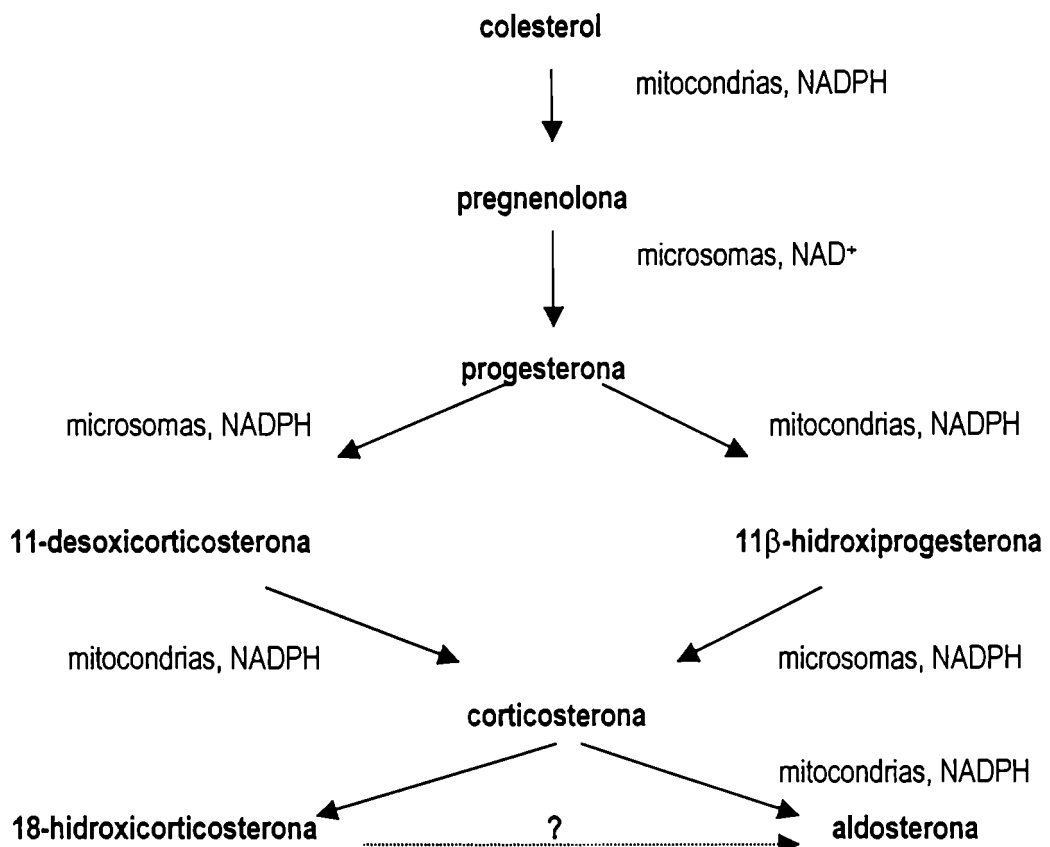
Hasta aquí, los estudios realizados, se hallaban focalizados fundamentalmente en la capacidad de algunos C₂₁-esteroides (progesterona y corticosterona) de transformarse en corticosterona, 18-hidroxycorticosterona y aldosterona. Poco se sabía, sin embargo, acerca de los pasos más tempranos del camino biosintético. Los trabajos de Mehdi y Carballeira (Mehdi y Carballeira, 1971a y b) se abocaron al estudio de la transformación de colesterol, pregnenolona y progesterona en interrenales de esta especie (Mehdi y Carballeira, 1971a y b), utilizando tanto cortes de interrenal como homogenatos y fracciones subcelulares. La incubación a 26°C de tejido interrenal de *R. catesbeiana* con pregnenolona-C¹⁴ o progesterona-C¹⁴, rinde fundamentalmente los tres esteroides ya mencionados y más abundantes de esta especie: corticosterona, 18-hidroxycorticosterona y aldosterona, demostrando también la presencia de desoxicorticosterona, 11-dehidrocorticosterona y 11β-hidroxiprogesterona.

Los estudios de distribución subcelular, indicaron también que la compartimentalización de las enzimas del camino biosintético es similar a aquella de mamíferos, esto es: 21 hidroxilasa de localización microsomal mientras que la 11β y 18 hidroxilasas son de localización mitocondrial. Nuevamente no se encontraron evidencias de la presencia de cortisol en esta especie.

Por otra parte, las incubaciones llevadas a cabo con colesterol-C¹⁴ y la fracción mitocondrial de adrenales de *R. catesbeiana*, permitieron confirmar que la escisión de la cadena lateral de colesterol, y por consiguiente su transformación en pregnenolona, se lleva a cabo en esta organela y requiere de NADPH como cofactor y O₂, tal cual fuera decripto para mamíferos.

La integración de todos los resultados de biosíntesis enunciados hasta aquí, permiten proponer para, *Rana catesbeiana*, la secuencia biosintética que se muestra en la Figura 3. Sin embargo, a pesar de todos los conocimientos que se tienen, aún existen dudas sobre algunos pasos.

Figura 3. Camino biosintético propuesto para *Rana catesbeiana*.



La baja capacidad precursora de aldosterona que tiene en esta especie 18-hidroxicorticosterona (Ulick y col., 1964; Greengard y col., 1967), no permite asignarle concluyentemente el papel de precursor inmediato, como así tampoco es posible conocer cuál de los dos caminos propuestos es el predominante para la síntesis de corticosterona.

Regulación de la biosíntesis de esteroides en *Rana catesbeiana*

Las primeras evidencias que en *R. catesbeiana*, la función interrenal se hallaba bajo el control de la ACTH hipofisaria se deben a Macchi (Macchi, 1955; Macchi y Phillips, 1966) y Carstensen y col. (Carstensen y col., 1959, 1961). Como ya fue mencionado, encontraron que

la ACTH de mamíferos tenía la capacidad de estimular la síntesis tanto de aldosterona como de corticosterona, indicando la existencia de control hipofisario tanto para gluco como los mineralocorticoides. La capacidad de aldosterona y corticosterona para ejercer retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de ACTH fue estudiada sobre animales a los cuales se les inyectaron ambos esteroides de manera tal de mantener elevados sus niveles circulantes (Piper y Roos, 1967). Los resultados obtenidos indican que tanto corticosterona como aldosterona tienen capacidad de regular la liberación de ACTH por la hipófisis a través de una retroalimentación negativa.

Existen factores extrahipofisarios con capacidad de regular la secreción de aldosterona, tales como los niveles de sodio circulantes. La hiponatremia (Ulick y Feinholtz, 1968; Davis y col., 1970; Braverman y col., 1973) estimula la producción y secreción de aldosterona; esto demuestra que la regulación de los mineralocorticoides por los niveles de sodio circulantes es un hecho filogenéticamente muy temprano. Sin embargo, por lo menos en esta especie, no hay relación entre los niveles de potasio y la síntesis de aldosterona. La hiperkalemia no produce efectos sobre los niveles de aldosterona plasmática (Davis y col., 1970) a diferencia de lo que ocurre en la rata, en la cual el aumento de potasio en plasma estimula la secreción del mineralocorticoide (Müller, 1971). Otro factor involucrado en la regulación de los niveles de aldosterona es el constituido por el sistema renina-angiotensina (Johnston, 1967; Taylor, 1972), que en esta y otras especies produce tanto una respuesta presora como un efecto sobre la esteroidogénesis. El extracto obtenido a partir de los riñones de rana es similar a la renina de mamíferos. Es estable a pH 2,6, no dializable, se destruye por calor, es digerible por tripsina y estimula tanto la secreción de aldosterona como la de desoxicorticosterona (Taylor, 1972; Wilson, 1984).

Regulación de la biosíntesis de esteroides en *Rana ridibunda*.

Esta especie merece una mención muy especial, pues si bien no ha sido analizada desde el punto de vista biosintético ha sido la más ampliamente estudiada con relación a la regulación de la función interrenal. Los estudios utilizando técnicas de superfusión demostraron que tanto corticosterona (Leboulenger y col., 1978; Feuilloley y col., 1990) como aldosterona (Delarue y col., 1979; Feuilloley y col., 1990) son estimuladas por ACTH1-24 sintética, así como por extracto hipofisario homólogo, AMP cíclico o dibutilil-AMP cíclico. Esta estimulación muestra una clara relación dosis-respuesta, produciéndose en todos los casos, a 28°C, dos veces más

aldosterona que corticosterona. Tanto la hipofisectomía como el tratamiento con dexametasona provocan una disminución en la producción de corticosterona y aldosterona (60 veces), manteniéndose constante la relación corticosterona/aldosterona (Netchitailo y col., 1984). Esto implicaría una estrecha relación hipófisis-interrenal, tanto para la regulación de los gluco como de los mineralocorticoides. Sin embargo se observa también una cierta independencia del eje en el funcionamiento de la glándula cuando se la analiza 20 días después de la hipofisectomía o del comienzo en el tratamiento con dexametasona (Netchitailo y col., 1984). Por otro lado, la inyección diaria durante 20 días, de ClNa 0.9%, provoca una disminución en la producción de aldosterona sin alterar la de corticosterona (Leboulenger y col., 1980; Leroux y col., 1980). El tratamiento de las glándulas interrenales con prostaglandinas (PGE1 y PGE2) produce un aumento dosis-dependiente, tanto de aldosterona como de corticosterona (Delarue y col., 1981a). El agregado de indometacina (inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas) provoca una disminución en la formación de corticosterona (del 84%) y de aldosterona (del 75%), sin afectar la estimulación de la esteroidogénesis por ACTH, que es uno de los más importantes reguladores de la función interrenal en esta especie (Perroteau y col., 1984; 1980; Delarue y col., 1981b; Feuilloley y col., 1990; Delarue y col., 1990). Estos resultados permitirían concluir que la biosíntesis de esteroides depende, por lo menos en *Rana ridibunda*, de prostaglandinas endógenas, no involucradas en la respuesta inducida por ACTH. El hecho que la respuesta a ACTH o a AMPc no se vea afectada por inhibidores de la síntesis de prostaglandinas indicaría que ACTH y All activan la esteroidogénesis por caminos distintos (Delarue y col., 1981a; Perroteau y col., 1984; Netchitailo y col., 1986). Todos los procesos involucrados en la regulación de la producción de esteroides y aún los niveles basales de los mismos son inhibidos por agentes que interfieren con la polimerización y despolimerización de los microfilamentos (Feuilloley y col., 1986, 1987; Netchitailo y col., 1985). Este hecho experimental sugiere un rol importante de dichas estructuras celulares en la esteroidogénesis basal e inducida, en la que no estarían involucrados los microtúbulos celulares (Feuilloley y col., 1987; Netchitailo y col., 1985).

Se ha descrito la acción de otros moduladores de la función interrenal en *Rana ridibunda*. Entre ellos, tenemos el Péptido Intestinal Vasoactivo (Leboulanger y col., 1984), acetilcolina (Benyamina y col., 1987), serotonina (Delarue y col., 1988), dopamina (Morra y col., 1990, 1991). Todos, con excepción de dopamina que tiene efecto inhibitorio, estimulan la síntesis tanto de aldosterona como de corticosterona. Otras sustancias que actúan sobre la interrenal son neuropéptidos tales como taquiquininas (Leboulenger y col., 1993), urotensinas (Conlon y

col., 1992; Feuilleley y col., 1994) y arginina vasotocina (AVT) (Larcher y col., 1989; 1992a,b,c) y PACAP (Yon y col., 1993). Todos ellos estimulan la función de la interrenal. Entre otros lugares AVT fue aislado también de las células cromafines (Larcher y col., 1989) lo que podría indicar para este péptido una función parácrina.

Biosíntesis de esteroides en *Bufo arenarum*

Los trabajos realizados en esta especie se reducen al estudio de la biosíntesis de esteroides en animales de primavera-verano y de otoño-invierno. Los trabajos realizados muestran que, cuando se utiliza pregnenolona- H^3 como sustrato, los productos más importantes que se obtienen son progesterona, desoxicorticosterona, corticosterona, 18-hidroxycorticosterona, aldosterona y un compuesto desconocido que fuera denominado "compuesto N" (Ceballos y col., 1983). No fue posible detectar la presencia de cortisol en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas. Otros resultados mostraron que existían diferencias importantes en cuanto a la relación aldosterona/corticosterona en función de la temperatura: cuando los animales eran mantenidos a una temperatura de $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, la relación era de aproximadamente 2. Sin embargo cuando los animales se mantenían a temperaturas superiores ($37^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$) y las incubaciones se realizaban a esa temperatura la relación aldosterona/corticosterona caía bruscamente a un valor de 0.5 (Ceballos y col., 1985). Este último valor es semejante al encontrado en animales aclimatados a bajas temperaturas ($5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$), en los cuales se observaba, también, un marcado aumento de la biosíntesis y secreción de corticosterona (Ceballos y col., 1992).

Cuando las incubaciones se realizaban utilizando corticosterona- H^3 como sustrato, independientemente de la temperatura de incubación y aclimatación, solo se obtenía 11-dehidrocorticosterona en grandes cantidades y una muy pequeña cantidad de 18-hidroxycorticosterona y aldosterona (Ceballos y col., 1983). Cuando el precursor utilizado era progesterona- H^3 , los productos mayoritarios eran desoxicorticosterona, corticosterona y, como en el caso anterior, una muy pequeña cantidad de 18-hidroxycorticosterona y aldosterona. Por otra parte, en incubaciones en las cuales se utilizaba pregnenolona- H^3 como sustrato y se agregaban cantidades crecientes de 21-hidroxipregnenolona o $11\beta,21$ -dihidroxipregnenolona, ambas radioinertes, se observó una disminución en la biosíntesis de aldosterona, 18-hidroxycorticosterona y el Compuesto N. Por el contrario, la biosíntesis de progesterona, desoxicorticosterona y corticosterona no se vio afectada.

Los resultados obtenidos permitieron sugerir que la biosíntesis mayoritaria de aldosterona podría transcurrir, en *Bufo arenarum*, por una vía que no incluye progesterona ni corticosterona como intermediarios.

Otras especies estudiadas

Con excepción de las tres especies mencionadas hasta aquí, el resto de los estudios realizados en otros anfibios anuros se reduce a trabajos aislados. La suma de todos ellos permiten dividir a las especies en dos grupos: 1) aquellas especies con actividad 17 α -hidroxilante, esto es, productoras de cortisol y 2) aquellas que no poseen la mencionada actividad, de tal manera que la corticosterona es su glucocorticoide más importante.

Dentro de la primera categoría podríamos mencionar a *Rana esculenta* (Lupo di Prisco y col., 1971; 1974; 1976) y *Bufo marinus* (Crabbé, 1963), mientras que en *Xenopus laevis* (Chan y Edwards, 1979), *Bufo arenarum* (Ceballos y col., 1983), *Rana ridibunda* (Leboulenger y col., 1978, 1989; Delarue y col., 1979; Feuilloley y col., 1990) y *Rana catesbeiana* (Mehdi y Carballeira, 1971a y b) no se ha detectado la presencia de cortisol ni cortisona. Esto indicaría, en principio, ausencia de actividad 17 α -hidroxilásica.

En la Tabla 1 se resumen los esteroides más comunes hallados en las especies estudiadas.

Tabla 1. Esteroides caracterizados en distintas especies de anfibios anuros.

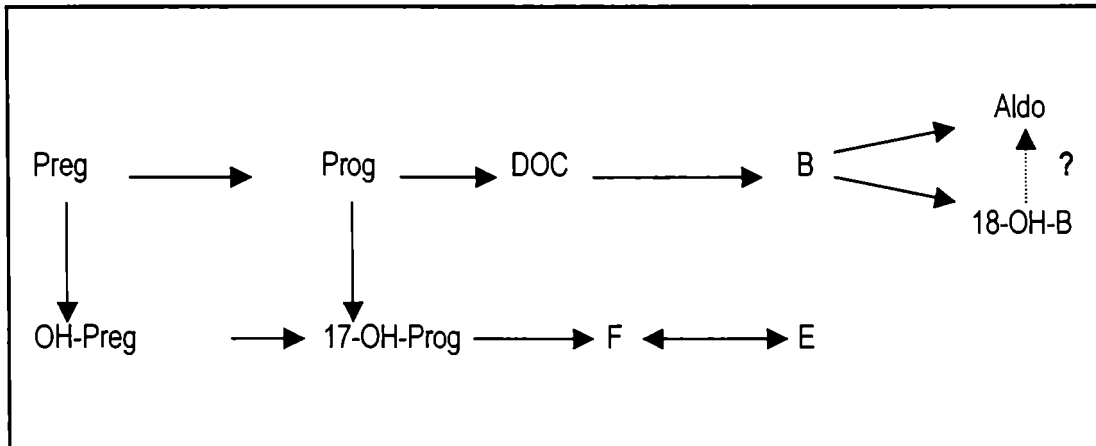
Especie	ALDO	B	18-OH-B	F
<i>R. esculenta</i>	Si	Si	ND	Si
<i>B. marinus</i>	Si	Si	Si	Si
<i>R. catesbiana</i>	Si	Si	Si	No
<i>R. ridibunda</i>	Si	Si	ND	No
<i>R. rugulosa</i>	Si	Si	Si	No
<i>R. pipiens</i>	Si	Si	Si	No
<i>R. temporaria</i>	Si	Si	ND	No
<i>X. laevis</i>	Si	Si	Si	No
<i>B. arenarum</i>	Si	Si	Si	No

Nota: ALDO: aldosterona; B: corticosterona; 18-OH-B: 18-hidroxicorticosterona; F: cortisol; ND: no determinado.

CAMINOS BIOSINTETICOS PROPUESTOS EN ANFIBIOS ANUROS

En lo que respecta a la biosíntesis de aldosterona, 18-hidroxicorticosterona y corticosterona, los resultados obtenidos hasta el momento, permiten proponer 3 caminos biosintéticos posibles:

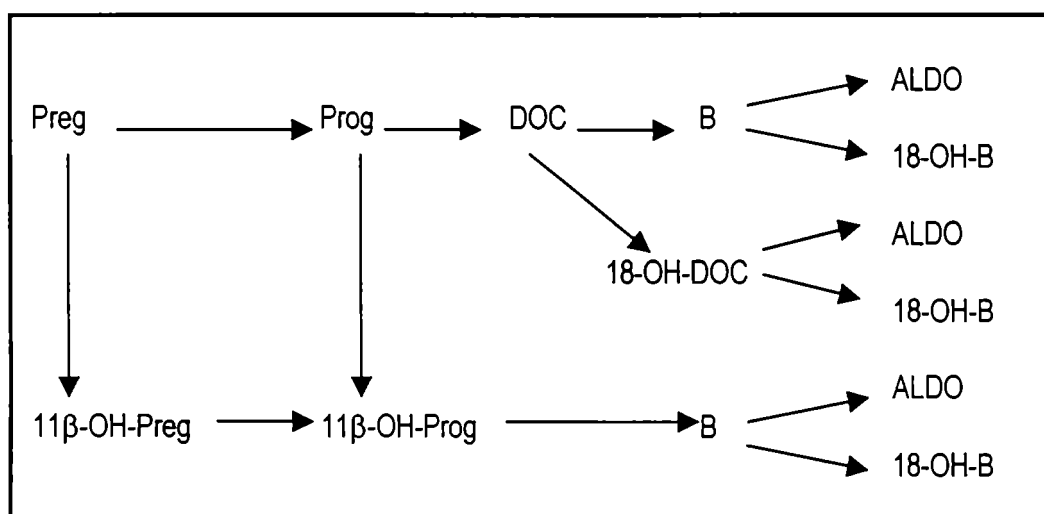
1) Para varias especies se postula:



Nota: Preg: pregnenolona; Prog: progesterona; DOC: desoxicorticosterona; B: corticosterona; 18-OH-B: 18-hidroxicorticosterona; Aldo: aldosterona; 17-OH-Preg: 17 α -hidroxipregnenolona; 17-OH-Prog: 17 α -hidroxiprogesterona; F: cortisol; E: cortisona.

Este camino podría proponerse tanto para las especies 17 α -hidroxilantes (Lupo di Prisco y col., 1971, 1974, 1976; Crabbé, 1963) como para las especies no productoras de cortisol tales como *Rana catesbeiana* (Mehdi y Carballeira, 1971a,b), *Rana rugulosa* (Chan y col., 1969; Chan y Phillips, 1971), *Xenopus laevis* (Chan y Edwards, 1970) .

2) Para *Rana pipiens* (Kraulis y Birmingham, 1964) se postula:

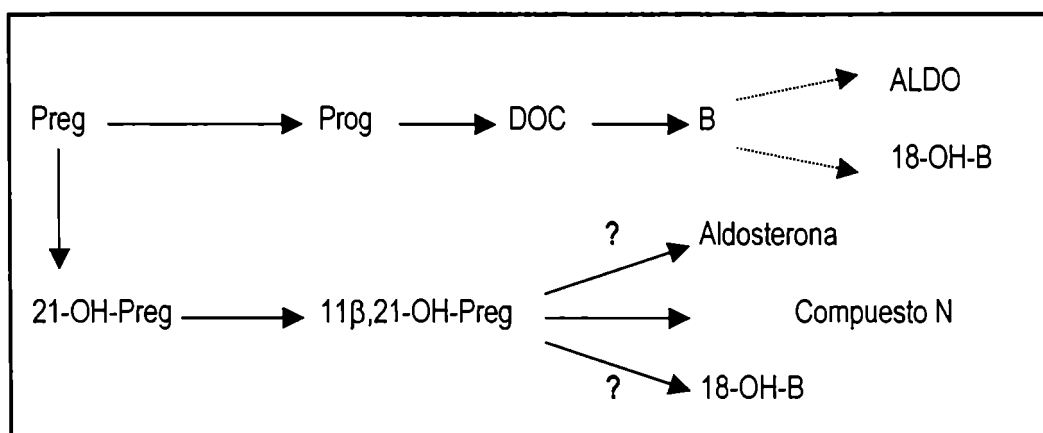


Nota: Preg: pregnenolona; Prog: progesterona; DOC: desoxicorticosterona; B: corticosterona; 18-OH-B: 18-hidroxicorticosterona; Aldo: aldosterona; 11 β -OH-Preg: 11 β -hidroxipregnenolona; 11 β -OH-Prog:

11 β -hidroxiprogesterona.

En esta especie los mayores rendimientos de corticosterona se obtuvieron a partir de 11 β -hidroxiprogesterona, siendo muy pequeños tanto a partir de 11-desoxicorticosterona como de progesterona (Kraulis y Birmingham, 1964). Estos resultados permitirían proponer que en esta especie la 11 β -hidroxilación para la biosíntesis de corticosterona ocurría antes que los precursores ingresen en la llamada "vía Δ^4 ".

3) Para *Bufo arenarum* (Ceballos y col., 1983) se postula:



Nota: Preg: pregnenolona; Prog: progesterona; DOC: desoxicorticosterona; B: corticosterona; 18-OH-B: 18-hidroxicorticosterona; Aldo: aldosterona; 21-OH-Preg: 21-hidroxipregnenolona; 11 β ,21-OH-Preg: 11 β ,21-dihidroxipregnenolona.

En todas las especies estudiadas parece haber una marcada relación entre la ACTH y los niveles de corticosterona y aldosterona. En *Rana esculenta* la hipofisectomía disminuye los niveles de aldosterona, corticosterona y cortisol circulantes, mientras que la ACTH de mamíferos provoca una recuperación parcial de estos efectos (Dupont y col., 1976). En *Rana pipiens*, Kraulis y Birmingham (Kraulis y Birmingham, 1964) hallaron que la ACTH de mamíferos es capaz de estimular la producción total de esteroides en la glándula interrenal, aún cuando los estudios mas importantes en esta especie se relacionan con el rol regulatorio que ejercen las condiciones salinas del medio sobre la producción de aldosterona y corticosterona (Jungreis y col., 1970; Jungreis y Johnston, 1979). Cuando se comparan los niveles circulantes de aldosterona en animales mantenidos en agua corriente con aquellos mantenidos en ClNa 0.15M, se observa en el segundo caso una marcada disminución (mayor al 90%) en los niveles

plasmáticos de aldosterona, consistente con la función sodio retentora de este esteroide. Los niveles de corticosterona por mantenimiento en aquel medio salino no se ven alterados. En *Xenopus laevis* (Pesonen y Rapola, 1962; Chan y Edwards, 1970;) y *Rana temporaria* (Hanke y Weber, 1964; Kloas y Hanke, 1992a) también se ha determinado que la ACTH estimula tanto la producción de corticosterona como de aldosterona; mientras que el aumento de K^+ o la disminución de Na^+ provocan, un aumento en los niveles de aldosterona circulante sin alterar los de corticosterona (Maser y col., 1981; Kloas y Hanke, 1992a).

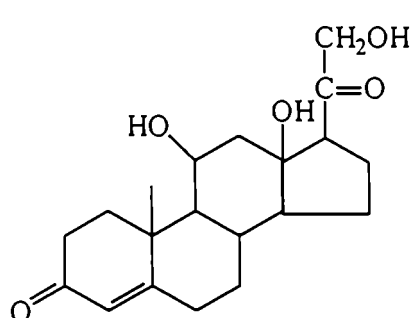
Otros péptidos que podrían regular la actividad interrenal son: el Péptido Natriurético Atrial (ANP) y la Angiotensina II (All). Se han descrito receptores para ANP en interrenal de *Rana temporaria* (Kloas y Hanke, 1992a) y *Xenopus laevis* (Kloas y Hanke, 1992b) y en este último también para All (Kloas y Hanke, 1992c). El ANP inhibe la secreción basal de aldosterona en forma dosis dependiente sin afectar la de corticosterona. Cuando se analiza la acción del ANP sobre la esteroidogénesis estimulada por ACTH, el efecto inhibitorio se observa sobre ambos esteroides (Kloas y Hanke, 1992d).

ULTIMOS PASOS DE LA SINTESIS DE ALDOSTERONA

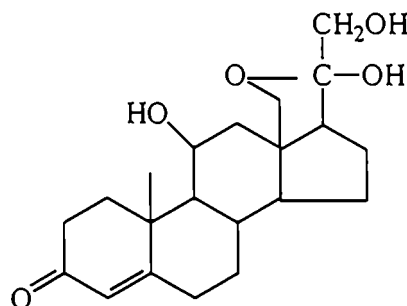
Gran número de evidencias sugieren que en mamíferos la corticosterona es el precursor mediato para la biosíntesis de aldosterona (Vecsei y col., 1968; Kojima y col., 1982). Este camino incluye a 18-hidroxycorticosterona como un intermediano teórico entre corticosterona y aldosterona. Sin embargo aún cuando se ha logrado demostrar su rol de intermediano en experimentos de captura (Vecsei y col., 1968), corticosterona es mucho mejor precursor que las formas de 18-hidroxycorticosterona aisladas habitualmente (Raman y col., 1966; Müller, 1971).

La 18-hidroxycorticosterona aislada de columnas, papel o cromatografía en capa delgada es estable en su forma C18-O-C20 hemicetálica, llamada forma "M".

Cuando esta forma aislada se almacena en metanol por cierto tiempo, se obtiene una forma menos polar que ya fuera analizada por diversos grupos de investigación (Dominguez, 1965; Damasco y Lantos, 1975; Aragonés y col., 1975). Esta forma llamada "L" (por less polar), es diez veces mejor precursor para la biosíntesis de aldo que la forma "M" original (Damasco y Lantos, 1975).



forma abierta

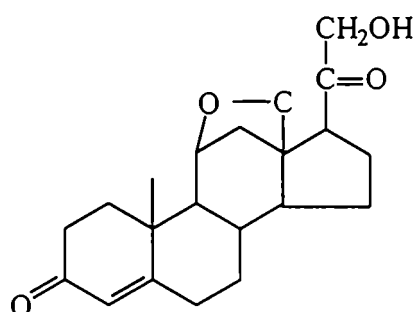


forma hemiacetalica

Otra familia de compuestos menos polares de 18-hidroxycorticosterona pueden obtenerse por una deshidratación e inversión del ciclo hemiacetalico de C18-O-C20 a C11-O-C18, mediada por protones, que son menos polares debido a la funcionalización del hidroxilo del C11. Tal es el caso de lo que se observa en la 18-desoxialdosterona (18-DAL). Este compuesto se obtiene en medio ácido acuoso; a pH 2 la deshidratación es instantánea.

Los primeros estudios sobre este éter C11-O-C18 formado en medio ácido, fueron realizados por Kondo (Kondo y *col.*, 1965). Esta estructura fue asignada tentativamente a un compuesto cuyo RM era 4.33 (movilidad relativa a 18-hidroxycorticosterona "M" en el sistema Bush B5) obtenido al resuspender la forma "M" del esteroide en CIH 0.01 N (Aragón y *col.*, 1975). El compuesto RM 4.33 fue también aislado por Cozza y *col.* (1985), quienes lo identificaron definitivamente como 18-desoxialdosterona (18-DAL) a través de estudios de espectroscopía de RMN protón y C¹³ (Cozza y *col.*, 1985).

Su estructura plana se muestra a continuación:

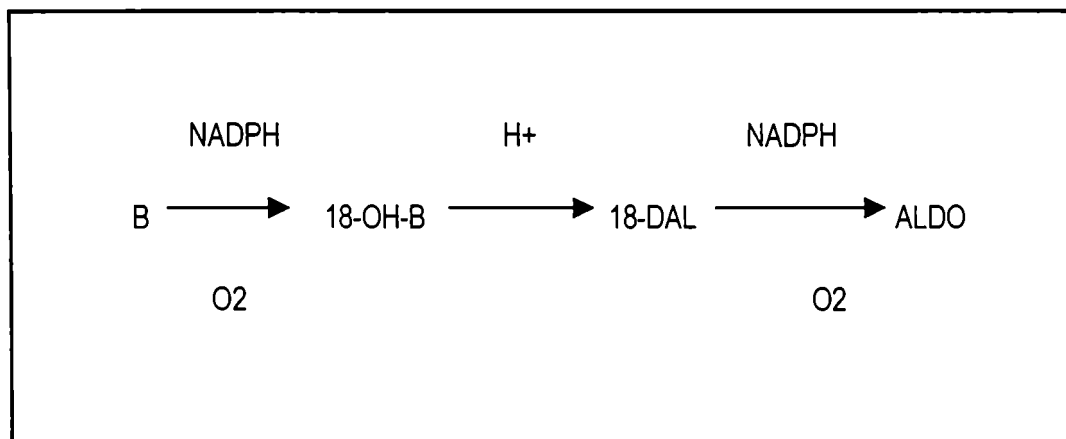


18-DAL

18-DAL posee mejores propiedades biosintéticas que la 18-hidroxycorticosterona "M" (Cozza y *col.*, 1985) requiriendo para su transformación en aldosterona de NADPH y oxígeno

molecular.

El camino propuesto por Cozza (Cozza y *col.*, 1987) sería el siguiente:



Nota: B: corticosterona; 18-OH-B: 18-hidroxicorticosterona; 18-DAL: 18 desoxialdosterona; Aldo: aldosterona

La conversión de 11-desoxicorticosterona (DOC) a corticosterona se produce por la 11 β -hidroxilación de la primera, catalizada por la enzima 11 β -hidroxilasa. Esta enzima es de localización mitocondrial (Satre y *col.*, 1969) y, en adrenales de rata y de vaca (Bjorkhem y Kalmar, 1977), participa también en la 18-hidroxilación de corticosterona para dar lugar a la formación de 18-hidroxicorticosterona. Debido a esto último, la enzima recibió el nombre de 11 β /18-hidroxilasa (Müller, 1988). En adrenales de rata, se han descrito dos formas de citocromo P450 11 β -hidroxilasa (Cyp11 β) que se han denominado Cyp11 β 1 y Cyp11 β 2. El Cyp11 β 2 posee una débil actividad de 11 β -hidroxilasa si se lo compara con el Cyp11 β 1 y su expresión es característica de la zona glomerulosa adrenal en la cual participa de la biosíntesis de aldosterona a partir de corticosterona (Yabu y *col.*, 1991). El Cyp11 β 1 se expresa fundamentalmente en la zona fasciculata de la adrenal de rata y su actividad se relaciona con la biosíntesis de corticosterona (glucocorticoide de esta especie) a partir de DOC (Ho y Vinson, 1993; Sander y *col.*, 1994).

Lo expuesto hasta aquí sugiere que en la rata, la transformación de DOC en aldosterona podría estar mediada por una única enzima que transformaría en forma sucesiva, DOC en corticosterona y esta a su vez en 18-hidroxicorticosterona y en aldosterona.

Sin embargo, a pesar de todos los adelantos obtenidos en los últimos 10 años, en

numerosas especies no se ha logrado dilucidar en forma concluyente el último paso de la biosíntesis de aldosterona.

.....Objetivos.....

OBJETIVOS

La información expuesta hasta aquí, consistió en una breve reseña del conocimiento adquirido sobre la esteroidogénesis y su regulación en vertebrados poiquilotermos y homeotermos. Los anfibios, por tratarse de organismos poiquilotermos, carecen de la capacidad de regular su temperatura corporal, aspecto que los convierten en un buen modelo para el estudio de la influencia de la temperatura sobre determinadas variables bioquímicas y fisiológicas. Por otro lado, sabemos que la glándula interrenal (y sus homólogos en vertebrados superiores) es una glándula de adaptación por excelencia sobre la cual podría verse reflejada la influencia de algunas variables ambientales, entre ellas la temperatura. Los objetivos de la presente Tesis pueden dividirse de la siguiente forma:

1. Estudio de la capacidad precursora de aldosterona de distintos esteroides tales como 18-hidroxycorticosterona (formas "M" y "L"), corticosterona y de un compuesto desconocido "N" obtenido a partir de incubaciones con pregnenolona (Ceballos y *col.*, 1983).
2. Caracterización química y bioquímica del compuesto desconocido N mediante diversas técnicas que incluyeron la cromatografía gaseosa y espectrometría de masa.
3. Estudios de localización y propiedades de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta 4$ isomerasa, enzima clave en la esteroidogénesis.
4. Estudios sobre la regulación de la actividad de la enzima antes mencionada.

..... Materiales y Métodos.....

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron sapos macho adultos de la especie *Bufo arenarum* H. cuyo peso oscilaba entre 150 y 180 grs., recolectados en los alrededores de las ciudades de Buenos Aires y La Plata. Los animales fueron mantenidos a luz y temperatura ambiente durante una semana en cautiverio antes de ser utilizados (Reinring y col., 1980). Durante ese período tuvieron libre acceso al agua.

Los ejemplares fueron capturados en distintas épocas del año. Se utilizaron animales de otoño-invierno y de primavera-verano.

Se utilizaron también ratas macho entre 180 y 200 grs. de peso de la cepa CHBB-Thom, pertenecientes al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Otros animales utilizados en esta tesis con fines comparativos fueron machos de pollo adultos, Genética Copp.

Aclimatación de los animales a distintas temperaturas

Los animales provenientes de distintas épocas del año se mantuvieron durante una semana a las siguientes temperaturas: 5°C, 28°C y 37°C y con un fotoperíodo de 12 hs de luz y 12 de oscuridad. Durante ese período podían acceder libremente al agua.

Aclimatación de los animales a distintas salinidades

Los animales fueron mantenidos durante 48 hs en recipientes que contenían 1 cm de NaCl 0.1 M, 0.125 M o 0.15 M, en condiciones de luz y temperatura ambiente (Jungreiss y Johnston, 1979). El medio se cambió dos veces por día durante las 48 hs de aclimatación.

OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DEL TEJIDO

Interrenales de sapo

Inicialmente los animales fueron sacrificados por dos métodos distintos, comparándose los efectos de cada uno de ellos sobre la formación de corticosterona (medida por cromatografía líquida de alta presión, ver mas adelante). En uno de los métodos los animales fueron desmedulados utilizando una aguja de desmedular y en el otro fueron anestesiados levemente con éter y posteriormente colocados en hielo. En ambos procesos la muerte se produce como

consecuencia del procedimiento quirúrgico posterior mientras los animales se hallan bajo los efectos del anestésico. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos utilizando ambos métodos. El análisis estadístico (test de Student) demuestra que no hay diferencias significativas entre los niveles de corticosterona obtenidos a partir de tejido interrenal proveniente de animales sacrificados por uno u otro método, razón por la cual se decidió utilizar el procedimiento que involucra éter y hielo por considerarlo menos cruento.

Tabla 2. Efecto del éter sobre la producción de corticosterona

Método	ng corticosterona/mg de tejido
Desmedulado	0.61 ± 0.03
Eter	0.59 ± 0.04

Nota: Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos por duplicado ± el error standard. La determinación de corticosterona se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para mas detalles ver en esta misma sección, mas adelante.

Una vez sacrificados los animales, se removieron rapidamente los riñones por disección ventral. Estos fueron colocados sobre hielo; luego se separaron cuidadosamente las glándulas interrenales que se hallan firmemente adosadas a la cara ventral del parénquima renal. El tejido interrenal se separó de los restos de tejido renal y se colocó en hielo, donde se conservó hasta el momento de su utilización. De acuerdo a las características de los experimentos, el tejido se procesó de dos maneras diferentes:

- Para incubaciones con cortes de interrenal: se cortaron las interrenales en fragmentos de aproximadamente 2 mm cada uno que se agruparon en muestras de pesos establecidos para cada experimento. Este método garantiza una distribución uniforme del tejido proveniente de cada interrenal en las distintas muestras.
- Para incubaciones con homogenatos: el tejido total a utilizar se homogeneizó en el buffer adecuado en una relación de 250 mg de tejido por cada ml de buffer.

En ambos casos el material se conservó a 4°C hasta el momento del experimento.

Adrenales de rata

Las ratas fueron decapitadas e inmediatamente se extrajeron las adrenales a las que, sobre hielo, se les quitó el tejido graso adherido. Las glándulas se cuartearon y los cuartos así obtenidos se reunieron en grupos de peso equivalente, teniendo en cuenta condiciones de muestreo que asegurarán equivalencia entre los distintos grupos. En algunos casos el tejido fue homogeneizado en una relación de 250 mg de tejido por ml del buffer correspondiente. En todas las situaciones el material fue conservado sobre hielo hasta el momento de comenzar los experimentos.

Adrenales de pollo

Los pollos fueron sacrificados por decapitación y las adrenales se disecaron rápidamente sobre hielo. El tejido así obtenido se homogeneizó en el buffer adecuado en una relación de 250 mg de tejido por ml.

Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre de sapo se obtuvieron por punsión cardíaca de animales anestesiados. La sangre se recogió con jeringas heparinizadas y se colocó en tubos de centrifuga igualmente heparinizados. Con el objeto de separar el plasma, la sangre se centrifugó a 3000 rpm en una centrifuga clínica, durante 10 min a 4°C. Los plasmas se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Soluciones buffer

La composición de las soluciones buffer variaron de acuerdo al modo de preparación del tejido adrenal/interrenal (cortes/cuartos u homogenatos) (Sibley, 1978).

Cuartos/cortes de adrenal/interrenal

NaCl	130,0 mM	SO ₄ Mg	1,3 mM	
ClK	5,2 mM	Glucosa	11,0 mM	
Cl ₂ Ca	2,6 mM	Buffer HCO ₃ ⁻ /H ₂ CO ₃	13,5 mM	pH = 7,4

Homogenatos

Buffer Fosfato de Potasio	20 mM		pH = 7,4
Sacarosa	250 mM		

EDTA 10 mM

Fraccionamiento subcelular. Se detalla en la sección correspondiente.

Actividad de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa: Se detalla mas adelante.

Condiciones de las incubaciones.

Las incubaciones con cortes de tejido fueron realizadas en vasos de vidrio neutro Schott-Jena-Mainz de 10 ml de capacidad, en un incubador metabólico Dubnoff con agitación, bajo atmósfera de carbógeno (O₂:CO₂ = 95:5), excepto en los casos indicados especialmente. El volumen de incubación fue de 2 ml salvo indicación en contrario.

Los experimentos con homogenato se llevaron a cabo en tubos de vidrio neutro de 5 ml de capacidad, en un incubador Dubnoff. El volumen de incubación fue de 2 ml.

Las condiciones para la medición de la actividad de la enzima 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa (3 β HSD/I) se detallan mas adelante.

Disolución de los precursores.

Los esteroides utilizados, disueltos en tolueno:etanol (9:1, v/v) o bien en benceno:etanol (9:1, v/v), tanto radiactivos como radioinertes, se colocaron en los vasos de incubación. Los esteroides disueltos se llevaron a sequedad bajo N₂ a temperatura ambiente. El residuo seco se tomó con 3 gotas de CH₂Cl₂ y 2 gotas de propilenglicol evaporándose luego el CH₂Cl₂ bajo N₂ a temperatura ambiente de tal forma que el esteroide quedara disuelto en el propilenglicol. En los experimentos en los cuales se utilizaban cortes/cuartos de tejido adrenal, a la suspensión del esteroide en propilenglicol se le agregaba el medio buffer y se colocaban en el incubador bajo carbógeno durante 30 min. con agitación. Pasado este periodo de preincubación, se agregaba el tejido a cada vaso de incubación.

En el caso de utilizar homogenato como fuente de enzimas, al esteroide precursor disuelto en propilenglicol se le agregaba directamente el volumen de homogenato correspondiente, el cual se hallaba ya en el buffer adecuado.

Los detalles del agregado de precursores para la determinación de la actividad de la enzima 3 β HSD/I se presentan mas adelante.

Temperaturas de incubación

Los experimentos realizados con interrenales de sapo se llevaron a cabo a 28°C. Los experimentos realizados con adrenales de rata y pollo se efectuaron a 37°C.

Extracción de los esteroides formados

Una vez finalizadas las distintas incubaciones, independientemente de las características de las mismas, los esteroides fueron extraídos del medio de incubación utilizando 3 volúmenes de cloruro de metileno. Las extracciones se repitieron 3 veces y las distintas fases orgánicas se mezclaron y evaporaron hasta residuo seco bajo atmósfera de N₂. En los casos en que correspondió, se agregaron marcadores C¹⁴, con el objeto de evaluar la purificación y cuantificar los productos formados. Los esteroides extraídos de los distintos medios de incubación fueron procesados utilizando distintos sistemas cromatográficos.

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS FORMADOS

Aldosterona. Para su cuantificación se siguió la técnica de Kliman y Peterson (1960). Brevemente, la zona correspondiente a aldosterona en el sistema Bush B5 (Benceno:Metanol: Agua; 2=1=1) (R_f = 0,31) (Bush, 1952), denominada aldosterona (aldo) impura, fue extraída con metanol (3 veces con 3 ml cada vez). Luego de finalizada la extracción, se tomó una alícuota correspondiente al 5% con el objeto de determinar la relación H³/C¹⁴ de dicha fracción. Con el fin de obtener el derivado diacetilado de aldosterona, el extracto metanólico remanente se llevó a sequedad y el residuo seco fue tratado con 0,2 ml de piridina anhidra y 0,2 ml de anhídrido acético durante 20 hs. a 30°C. La reacción se frenó con el agregado de 2 ml de metanol, luego de lo cual se llevó a residuo seco de la manera habitual. El residuo así obtenido, fue analizado por cromatografía en papel Whatman N° 1 en el sistema CyDi I (Kliman y Peterson, 1960) (ciclohexano:dioxano:metanol:agua; 4:4:2:1). Los cromatogramas obtenidos se revelaron utilizando un radiocromatógrafo (Radiocromatógrafo Packard, Modelo 7201). Las zonas radiactivas correspondientes al diacetato de aldosterona se eluyeron con metanol. Un 10% del extracto metabólico total se utilizó como alícuota para determinar la relación H³/C¹⁴ utilizando un contador de centelleo líquido (Mark III, Tracor Analytic, Modelo 6882). El volumen remanente se llevó a sequedad y se trató con 2 ml de CrO₃ al 0,5% p/v en ácido acético glacial durante 15 minutos a 28°C en oscuridad, con el objeto de obtener la lactona de aldosterona. Una vez finalizado dicho período, se agregó 1 ml de agua destilada, se agitó, y la solución resultante se extrajo 3 veces con 6 ml de Cloruro de metileno. El extracto orgánico se lavó dos veces con 1 ml de agua cada vez y se llevó a sequedad. El residuo seco fue analizado por cromatografía en papel Whatman N° 1 en el sistema CyDi I. Se revelaron los cromatogramas y se eluyeron las

zonas radiactivas correspondientes a las lactonas de aldosterona, que fueron eluidas con metanol. Una alícuota correspondiente al 20% del total se utilizó para medir la relación H^3/C^{14} mientras que el volumen restante se llevó a sequedad. Con el objeto de verificar la pureza de la lactona de aldosterona, el residuo seco se analizó por cromatografía en papel en el sistema CyBz (Bush, 1952) (ciclohexano:benceno:metanol:agua; 4:3:4:1). Una vez revelados los cromatogramas, se eluyeron las zonas radiactivas determinándose las relaciones H^3/C^{14} en el volumen total.

Las relaciones H^3/C^{14} obtenidas a lo largo del proceso de purificación nos permiten, utilizando el método de dilución isotópica, calcular el grado de pureza de la fracción. El criterio adoptado consiste en obtener constancia en la relación H^3/C^{14} luego de dos pasos sucesivos de purificación. En los experimentos analizados en la presente tesis, dicha relación se mantuvo constante luego de la cromatografía de las lactonas en los sistemas CyDi I y CyBz, aunque en varios casos se verificó la constancia a partir del diacetato de aldosterona.

El porcentaje de aldosterona- H^3 producida en la incubación, se calculó teniendo en cuenta las pérdidas sufridas a través de los pasos de purificación. Las mismas se calcularon considerando las pérdidas sufridas por el marcador, en este caso aldosterona- C^{14} .

Corticosterona. Tanto para establecer el grado de pureza de la fracción como para cuantificar su producción, se utilizó el método de dilución isotópica tal cual se planteó en el párrafo anterior. La zona correspondiente a corticosterona (B) en el sistema Tolueno- Propilenglicol (T-PG) (Zaffaroni y Burton, 1951) se eluyó de la manera habitual con metanol. Se separó una alícuota correspondiente al 5% del total con el objeto de determinar la relación H^3/C^{14} . El volumen remanente fue llevado a sequedad y tratado en condiciones anhidras con 0,2 ml de piridina y 0,2 ml de anhídrido acético durante 15 hs. a 30°C en oscuridad, con el objeto de obtener el acetato de B. La reacción se frenó de la manera ya descripta y el/los productos formados fueron analizados por cromatografía en papel en el sistema CyDi I. La fracción correspondiente al acetato de B fue eluida de la manera habitual, tomándose una alícuota correspondiente al 10% del volumen total para determinar la relación H^3/C^{14} . A fin de determinar el grado de pureza del acetato, el volumen restante se llevó a sequedad y se cromatografió en el sistema T-PG. La zona radiactiva evidenciada después del revelado por radiocromatografía fue eluida con metanol. Una fracción correspondiente al 15% del volumen total se utilizó como alícuota para medir la relación H^3/C^{14} mientras que el volumen restante se llevó a sequedad. El residuo seco fue tratado con 0,5 ml de $HKCO_3$ al 0,4% en metanol durante 8 hs. a 30°C en atmósfera de N_2 y en oscuridad.

Pasado dicho tiempo se agregó 1 ml de agua y se extrajo 3 veces con Cloruro de metileno (Bush y Willoughby, 1957). El extracto orgánico se secó con Na_2SO_4 (anhidro) y se evaporó bajo N_2 , cromatografiándolo luego en el sistema T-PG. El revelado de la cromatografía evidenció la presencia de un solo pico correspondiente a la forma no acetilada de B (comparada contra un standard radioinerte). En una alícuota correspondiente al 50% del volumen total se midió la relación H^3/C^{14} a lo largo de los sucesivos pasos de purificación.

18-Hidroxycorticosterona (18OHB). Este compuesto fue caracterizado por su capacidad de transformarse en formas menos polares cuando se lo trata en medio ácido. Para ello se procedió de acuerdo con Aragonés (Aragonés y col., 1975). El esteroide biosintético, se llevó a residuo seco y se suspendió en 0,2 ml de HCl 10^{-2} M. Luego de 10 minutos la suspensión se sembró en papel Whatman N° 1 y se desarrolló cromatográficamente en el sistema Bush B5. Finalizada la cromatografía se detectaron las zonas radiactivas se eluyó el material radiactivo correspondiente a cada pico (3 veces con 4 ml de metanol) y se tomaron alícuotas de los extractos metanólicos obtenidos de la elución. La radiactividad en cada una de ellas se midió utilizando un contador de centelleo líquido, con corrección automática para quenching variable. Los RM de los picos obtenidos se calcularon en relación a la movilidad de 18OHB que se corrió paralelamente. Se obtuvo solo una forma menos polar de $\text{RM} = 3,1$ a diferencia de las 4 formas menos polares obtenidas por Aragonés y col. (1975).

Se estudió también la reversibilidad de la forma menos polar obtenida, en distintas condiciones:

- 1 día en residuo seco, bajo N_2 .
- 1 día en NH_3 0.05%, bajo N_2 .
- 7 días en NH_3 0.05%, bajo N_2 .

La forma menos polar, obtenida de acuerdo al procedimiento ya mencionado, fue fraccionada en cuatro partes, cada una de las cuales se llevó a residuo seco (37°C ; N_2). Dos de las cuatro fracciones se dejaron a 27°C en oscuridad bajo N_2 durante 1 y 7 días respectivamente. Los otros dos residuos secos fueron resuspendidos en 0,5 ml de una solución acuosa de NH_3 0,013 N y se dejaron a 27°C en oscuridad bajo N_2 durante 1 y 7 días.

Terminados los períodos de tiempo establecidos para cada caso, las fracciones que se hallaban en residuo seco fueron tomadas con Cloruro de metileno y se sembraron sobre papel

Whatman N° 1 para ser cromatografiadas en el sistema Bush B5. Las fracciones resuspendidas en la solución acuosa de NH₃, se neutralizaron con HCl y se llevaron a sequedad bajo N₂ a 37°C. Los residuos secos así obtenidos se tomaron con Cloruro de metileno y se cromatografiaron en el sistema Bush B5. Los cromatogramas fueron radiocromatografiados y luego de medir el R_f, el material de cada zona radiactiva se eluyó con metanol. La radiactividad en cada fracción se determinó por centelleo líquido.

Compuesto "N". El compuesto "N" se aisló del sistema Bush B5 con un R_f de 0,21, movilidad intermedia entre 18OHB (R_f = 0,13) y aldosterona (R_f = 0,30). Con el objeto de caracterizar el compuesto, se lo sometió a una serie de análisis. Para biosintetizar el esteroide en las cantidades necesarias para cada experimento, se procedió de la siguiente manera (Ceballos y col., 1983): Se incubaron 4 µCi de pregnenolona-H³ por 2 hs con 60 mg de tejido en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato. Finalizado el tiempo de incubación los esteroides se extrajeron de la manera habitual y el compuesto "N" fue obtenido del sistema Bush B5, como el material que poseía una R_f de 0.21. Cuando, por la característica de los experimentos, se necesitaba contar con una actividad específica determinada, se utilizaba como sustrato pregnenolona-H³ y radioinerte.

➤ Caracterización cromatográfica. Se determinaron las movilidades absolutas y relativas de "N" en los siguientes sistemas: Bush B5, Cy : Di I ambos en papel y en cromatografía en placa delgada en el sistema Acetato de etilo:benceno:metanol (105:45:15). Los esteroides de referencia utilizados fueron cortisol, 18OHB, aldosterona y 5-pregnen-18-oxo-3β,11β,21-triol-20-one (aquí denominado, por razones de simplificación, "3β hidroxí-5-ene análogo de aldosterona" o 5-HAA), este último cedido por el Dr. M. Harnik de la Universidad de Tel Aviv, Israel y 19-OH-B cedido por el Dr. R. Neher, Friedrich Mieschner Institut and CIBA-Geygy, Basilea, Suiza.

➤ Tratamiento en medio ácido. Para el tratamiento en medio ácido se procedió de acuerdo con Aragonés y col. (1975). Para ello se trataron 0,16 µCi de "N" durante 10 minutos con 0,5 ml de HCl 10⁻² "N". Después de ello la mezcla se cromatografió en el sistema Bush B5 analizándose luego los productos obtenidos.

➤ Tratamiento en medio alcalino. El esteroide radiactivo se trató por distintos tiempos con 0,2 ml de una solución de amoníaco 0,05%. Los tiempos utilizados fueron 1, 7 y 15 días. Finalizados los mismos la mezcla de incubación se procesó como ya fuera descripto para las formas menos polares de 18OHB.

➤ Saponificación. Para realizar la saponificación del acetato de "N" o de "N" sin acetilar se procedió de la siguiente manera: 0,16 μ Ci del esteroide radiactivo se disolvieron en 0,5 ml de KHCO_3 0,4% en metanol. La reacción se dejó transcurrir durante 8 hs. a 30°C en oscuridad, después de lo cual los esteroides se extrajeron de la manera habitual y se cromatografiaron en el sistema Bush B5 (Bush, 1952; Bush y Willoughby, 1957).

➤ Acetilación. El compuesto "N" fue acetilado con 0,2 ml de piridina y 0,2 ml de anhídrido acético en distintas condiciones:

1. 6 hs. a temperatura ambiente. Los esteroides de referencia utilizados fueron: pregnenolona, 5-HAA y desoxicorticosterona (DOC). Los esteroides obtenidos fueron procesados en los sistemas Bush B1 ("N" y 5-HAA) y Bush A (DOC), ambos en papel. Pregnenolona y sus derivados fueron analizados por cromatografía en capa delgada (TLC) en el sistema B (benceno:etanol; 95:5, v/v).
2. 15 hs. a 30°C. Esteroides de referencia: DOC, aldosterona y 5-HAA. Los productos obtenidos se analizaron en los sistemas Bush A (DOC), Cy:Di I (aldosterona) y Bush B1 ("N" y 5-HAA).
3. 20 hs. a 30°C., Esteroides de referencia: aldosterona y 5-HAA. Los productos se analizaron en los sistemas Cy:Di I (aldosterona), y Bush A y Bush B1 ("N" y 5-HAA).

Todos los esteroides de referencia utilizados, con excepción de 5-HAA fueron radioactivos. En todos los casos el esteroide 5-HAA se reveló en papel de la siguiente manera: la tira de papel fue rociada con una solución saturada de Cl_3Sb en cloroformo con 20% de anhídrido acético. Luego de esto se la calentó a 90-100°C durante 3 a 5 minutos. Los 3 β -hidroxi-5-ene esteroides toman una coloración rojo-anaranjada.

ESTUDIOS DE ESPECTROMETRIA DE MASA-CROMATOGRAFIA GASEOSA (CGL-M)

Los estudios de espectrometría de masa fueron realizados por el Dr. Cedric Shackleton en el Instituto de Investigaciones del Hospital de Niños de Oakland, California, USA. Las muestras de 3- β -hidroxi-5-ene-análogo de aldosterona y "N" fueron derivatizadas a trimetilsililéteres y trimetilsililéteres - metiloximas, de acuerdo con Honour y Shackleton (1977). El análisis de los derivados se llevó a cabo con un equipo Hewlett Packard 5970A, usando una columna capilar de 15 mts DB-1. Las muestras fueron transportadas en tubos cónicos especiales con sus paredes siliconadas con trimetilsilano y con tapas de bakelita revestidas con teflón.

El esteroide de referencia 3 β -hidroxi-5-ene-análogo de aldosterona fue obtenido por un procedimiento de síntesis orgánicas y microbiológica (Hamik y *col.*, 1985) por el Dr. Marcel Hamik de la Universidad de Tel Aviv, Israel.

Biosíntesis y purificación del compuesto "N".

El compuesto "N" fue biosintetizado en las condiciones mencionadas en párrafos anteriores, utilizando tanto pregnenolona-H³ como radioinerte. El material proveniente del sistema Bush B5, luego de ser filtrado por lana de vidrio, fue purificado utilizando cromatografía líquida de alta presión (ver mas adelante).

Derivatización

Las muestras de 3- β -hidroxi-5-ene-análogo de aldosterona y "N" fueron derivatizadas a trimetilsililéteres y trimetil sililéteres - metiloximas, de acuerdo con Honour y Shackleton (1977). Para ello se procedió de la siguiente manera:

- Derivados TMS: Este derivado se preparó en tubos de vidrio usando 100 μ l de bistrimetilsilil trifluoroacetamida que contenía 1% de trimetilsililimidazol. Las muestras se calentaron a 60°C por 1 hora, después de lo cual se inyectaron directamente en el espectrógrafo de masa.
- Derivados TMS-MO: Para preparar estos derivados, las muestras se dejaron en contacto toda la noche con 100 μ l de una solución de hidrocloreuro de metoxiamina (2%, v/v en piridina). Las muestras se llevaron a residuo seco bajo N₂, después de lo cual se agregaron 100 μ l de trimetilclorosilano y se dejaron en contacto con el agente sililante durante 1 hora a 100°C. Los derivados TMS-MO se purificaron por cromatografía en Lipidex con el objeto de remover el exceso de reactivo. Las muestras fueron inyectadas en ciclohexano.

DETERMINACION DE CONTENIDOS ENDOGENOS.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se utilizó con distintos fines:

- *Analíticos.* Determinación de los tiempos de retención del compuesto "N" y 5-HAA.
- *Separativos.* Separar aldosterona, corticosterona y el compuesto "N" para realizar posteriormente radioinmunoanálisis.
- *Cuantitativos.* Para cuantificar los contenidos endógenos de corticosterona.

Para ello se utilizó un equipo Waters Associates (Mildford, Mass., U.S.A.) equipado con un

sistema propulsor de solventes modelo 6000 A, un inyector modelo U6K, un detector continuo de absorbancia modelo 440 (detector de longitud de onda fija) para monitorear el efluente a 254 nm, y un registrador Omni Scribe modelo B-5117-1, de una sola pluma. Para los esteroides que no absorben a 254 nm, se utilizó un detector de longitud de onda variable, que fue fijada en 210 nm.

Las columnas utilizadas eran de acero inoxidable de 300 mm de largo por 3,9 mm de diámetro interno y contenían como relleno partículas de sílica unidas con octadecasilano (m-Bondapak C-18) por lo cual las corridas cromatográficas resultaron de fase reversa (Knox y Pryde, 1975; Wikby y *col.*, 1978).

Antes de cada una de las determinaciones, la columna fue lavada sucesivamente con agua y metanol hasta obtener una línea de base constante.

Todos los solventes utilizados fueron redestilados antes de su uso. El agua fue destilada dos veces sobre vidrio. Antes de su empleo todos los solventes fueron filtrados a través de filtros Millipore (Tipo HA de tamaño de poro 0,45 mm para agua y Tipo FH de tamaño de poro 0,5 mm para los otros).

Preparación de las muestras.

Los contenidos endógenos de corticosterona fueron determinados en cuatro experimentos por duplicado de acuerdo con Cozza (Cozza y *col.*, 1983). Para ello se utilizaron 100 mg de tejido interrenal. El tejido fue homogeneizado con 2 ml de etanol al 20% de agua y el homogenato fue extraído 3 veces con 6 ml de Cloruro de metileno por vez. El extracto orgánico fue llevado a residuo seco bajo N₂ después de lo cual fue resuspendido en 2 ml de metanol. A cada muestra se le agregaron cantidades pequeñas de Corticosterona-C¹⁴ con el objeto de determinar las pérdidas sufridas durante el proceso de purificación y el grado de pureza de los esteroides medidos utilizando el método de dilución isotópica. El extracto metanólico se conservó toda la noche a 4°C para la separación de las grasas. Transcurrido ese período, las muestras se filtraron a través de lana de vidrio y el filtrado se evaporó bajo N₂ hasta sequedad. El extracto seco se resuspendió en metanol:agua (70:30, v/v) y en estas condiciones fue inyectado en el cromatógrafo para la separación de los esteroides.

La velocidad de flujo utilizado fue de 0,2 ml/min para la colección de fracciones provenientes de la inyección de muestras impurificadas y de 1 ml/min para la determinación de muestras puras provenientes del reciclado de las fracciones colectadas.

Los picos correspondientes a corticosterona fueron recolectados y recromatografiados secuencialmente en 5 fases móviles distintas (Tabla 3). En todas las fases móviles utilizadas se obtuvo un solo pico.

Para la cuantificación de cada uno de los esteroides endógenos se utilizó el material proveniente del último paso de purificación.

Tabla 3. Actividades específicas obtenidas durante la purificación de corticosterona

Fase móvil	Índice de polaridad	Actividad específica
Metanol:agua (70:30)	7.3	357.2 ± 46.2
Metanol	6.6	337.2 ± 28.5
Acetonitrilo:agua (85:15)	6.6	325.0 ± 21.7
Acetonitrilo	6.2	336.4 ± 19.0
Metanol:agua (50:50)	7.8	303.5 ± 19.4
Metanol:agua (70:30)	7.3	319.7 ± 16.7

Nota: Las actividades específicas están expresadas como dpm/ng ± error standard. Se obtuvieron recromatografiando las fracciones correspondientes a corticosterona.

Tiempos de retención del compuesto "N" y 5-HAA

Los tiempos de retención del compuesto "N"-H³ y 5-HAA fueron calculados utilizando como mezcla de solventes, metanol:agua (80:20, v/v). El flujo utilizado fue de 1 ml por minuto. La longitud de onda se fijó en 210 nm. La mínima cantidad de 5-HAA que pudo ser detectada fue de 30 µg y su tiempo de retención fue de 7.54 ± 0.04. El tiempo de retención del compuesto "N"-H³ fue determinado colectando las muestras cada 20 segundos, con un colector automático de fracciones y contando la radioactividad en cada muestra. Su tiempo de retención fue de 7.57 ± 0.03.

Tiempos de retención de corticosterona, 18-hidroxycorticosterona y aldosterona

Los tiempos de retención de los esteroides mencionados fueron calculados utilizando como

mezcla de solventes, metanol:agua (80:20, v/v). El flujo fue de 1 ml por minuto. La longitud de onda se fijó en 254 nm. Los tiempos de retención fueron: 4.25 ± 0.3 para 18-hidroxicorticosterona, 8.7 ± 0.5 para aldosterona y 14.3 ± 0.6 para corticosterona

ESTUDIOS DE BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de aldosterona, se llevaron a cabo incubaciones utilizando distintos precursores. Las incubaciones se llevaron en las distintas condiciones que se detallan a continuación.

Capacidad precursora de aldosterona de 18-hidroxicorticosterona (18OHB "M" y "L")

Con el objeto de estudiar la capacidad precursora de aldosterona de 18OHB (formas M y L) se procedió de la siguiente manera: se incubaron 0.6 μCi de 18OHB- H^3 comercial ó biosintética de sapo ó bien las formas menos polares mayoritarias obtenidas a partir de aquellas (ver secciones anteriores). Las incubaciones se realizaron con ó sin tejido interrenal (50 ± 3 mg) proveniente de animales capturados en distintas épocas del año, durante 30, 60 y 120 minutos. La formación de aldosterona fue cuantificada utilizando el método ya descrito. Cuando se utilizó homogenato como fuente de enzimas, la concentración de cada uno de los sustratos fue de 10 μM (A.e.= 72 mCi/mmol) en un volumen final de 1 ml. La cantidad de enzima utilizada correspondió al homogenato proveniente de 50 mg de tejido. Los cofactores utilizados fueron: NAD^+ , NADH , NADP^+ y NADPH (para todos la concentración fue 0.5 mM). También se utilizó un sistema regenerante de NADPH que consistió en el agregado de NADP^+ (0.5 mM) y malato (5 mM).

Capacidad precursora de aldosterona del compuesto "N".

Todos los experimentos que se llevaron a cabo para determinar la capacidad precursora del compuesto "N" involucraron la biosíntesis preparativa previa del mismo a partir de pregnenolona- H^3 . Para ello se utilizaron las condiciones óptimas descritas mas arriba, esto es: incubación de 100 mg de interrenal en presencia de 4 μCi de pregnenolona- H^3 en un volumen de incubación de 2 ml de buffer Krebs Ringer bicarbonato-glucosa, pH 7,4. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 120 minutos a 28°C. Finalizada la incubación los esteroides se extrajeron y procesaron de la manera habitual. El compuesto "N" se aisló del sistema Bush B5. La cantidad obtenida en cada incubación fue de aproximadamente 0,30 μCi .

Los experimentos de capacidad biosintética de "N" se realizaron incubando 0.4 μCi de "N"- H^3

con 50 ± 3 mg de tejido interrenal durante 30, 60, 90 y 120 minutos, a 28°C. Los esteroides obtenidos se procesaron como ya fuera descrito. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado y en cada caso el control se realizó incubando el precursor radiactivo en ausencia de tejido.

Requerimiento de cofactores de la transformación de "N" en aldosterona

Se realizaron experimentos para determinar el requerimiento de cofactores de la transformación de "N" en su principal producto, aldosterona. Para ello se incubaron homogenatos provenientes de 30 mg de tejido durante distintos tiempos, a 28°C, en ausencia y presencia de los siguientes cofactores: NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH, todos ellos en concentraciones de 0,5 mM. En cada caso se utilizaron 0,4 μ Ci del compuesto "N"-H³, A.e.= 72 mCi/mmol.

Efecto de cianocetona (CNK) sobre la transformación de "N" en aldosterona

Para ello se incubaron homogenatos provenientes de 30 mg de tejido durante 30 minutos a 28°C, con 0.5 mM de NAD⁺. En cada caso se utilizaron 0,4 μ Ci del compuesto "N"-H³, A.e.= 72 mCi/mmol. Las incubaciones se llevaron en ausencia o presencia de distintas concentraciones de CNK (10^{-4} - 10^{-6}). Las concentraciones de CNK fueron seleccionadas a partir de experimentos previos en los cuales se midió el efecto del inhibidor sobre la transformación de pregnenolona-H³ a progesterona-H³.

EXPERIMENTOS DE INCUBACION DE "N" CON LA ENZIMA 3 β HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

La enzima proveniente de Sigma Co. es purificada de *Pseudomonas testosteroni* y posee actividad de 3 β y 17 α -deshidrogenasa. Las incubaciones se realizaron utilizando distintos precursores radiactivos tales como pregnenolona, corticosterona, aldosterona y el compuesto "N" en buffer pirofosfato 100 mM pH 8,9 con 6mM de NAD⁺ y 0,3 U/ml de la enzima, en un volumen de incubación de 1ml durante 20 minutos a 25°C. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que oxida un mmol de sustrato por minuto en presencia de NAD⁺ a pH 8,9 y 25°C. Los productos formados fueron procesados de la forma habitual y cromatografiados en los sistemas ya descritos.

En algunos experimentos se variaron las condiciones de incubación, utilizando buffer fosfato 100 mM, pH 7,2, 28°C.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo de la siguiente manera: Las interrenales de sapo y las adrenales de rata y pollo se homogeneizaron en buffer T (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, sacarosa 0,25 M, β -mercaptoetanol 0,4 mM, EDTA 0,1 mM) en un homogenizador vidrio-teflón. Se utilizó una relación de 1 gr de tejido por cada 4 ml de buffer para las dos primeras especies mencionadas. En el caso de las adrenales de pollo la relación fue de 1 gr cada 2 ml de buffer, debido al gran contenido de agua del tejido. Los homogenatos así obtenidos se diluyeron al medio en el mismo buffer después de lo cual, y luego de separar una alícuota equivalente al 15% del total, se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos. Luego de dos lavados y de repetir las centrifugaciones en las condiciones antes mencionadas se obtuvo un pellet al que se denominó *fracción nuclear*. Todos los sobrenadantes obtenidos luego de centrifugar a 800 g se mezclaron y se centrifugaron a 15000 g por 20 minutos. Se realizaron dos lavados sucesivos y al pellet final se lo llamó *fracción mitocondrial impura*. Los sobrenadantes se centrifugaron a 105000 g por 90 minutos para obtener las *fracciones microsomal y soluble* (ver Fig. 7). Las mitocondrias fueron purificadas utilizando sacarosa 0,88 M en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, β -mercaptoetanol 0,4 mM, EDTA 0,1 mM (170) ó bien Ficoll 6% en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, β -mercaptoetanol 0,4 mM, EDTA 0,1 mM (171) de la siguiente manera:

Sacarosa 0,88 M: El 60% de las mitocondrias impuras obtenidas luego del procedimiento descrito más arriba se sembraron delicadamente sobre sacarosa 0,88 M en una relación de 1 ml de muestra a 7 ml de sacarosa. Después del proceso descrito la preparación se centrifugó a 18000 g durante 20 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en buffer T para ser nuevamente centrifugado durante 20 minutos a 15000 g (lavado). El pellet final se denominó *fracción mitocondrial purificada*.

Ficoll 6%: El 60% de las mitocondrias impuras se lleva a una concentración de 3% de Ficoll en buffer T sin sacarosa. Esta suspensión se siembra sobre Ficoll 6% en buffer T sin sacarosa en una relación de 1 ml de Ficoll 3% por 10 ml de Ficoll 6%. La preparación se centrifuga durante 20 minutos a 18000 g. El pellet así obtenido se lava una vez con buffer T centrifugándolo a 15000 g por 20 minutos. El pellet se llamó *fracción mitocondrial purificada*.

Como criterio de pureza de las fracciones obtenidas se midieron los siguientes marcadores enzimáticos:

Succinato deshidrogenasa (SDH) para la fracción mitocondrial

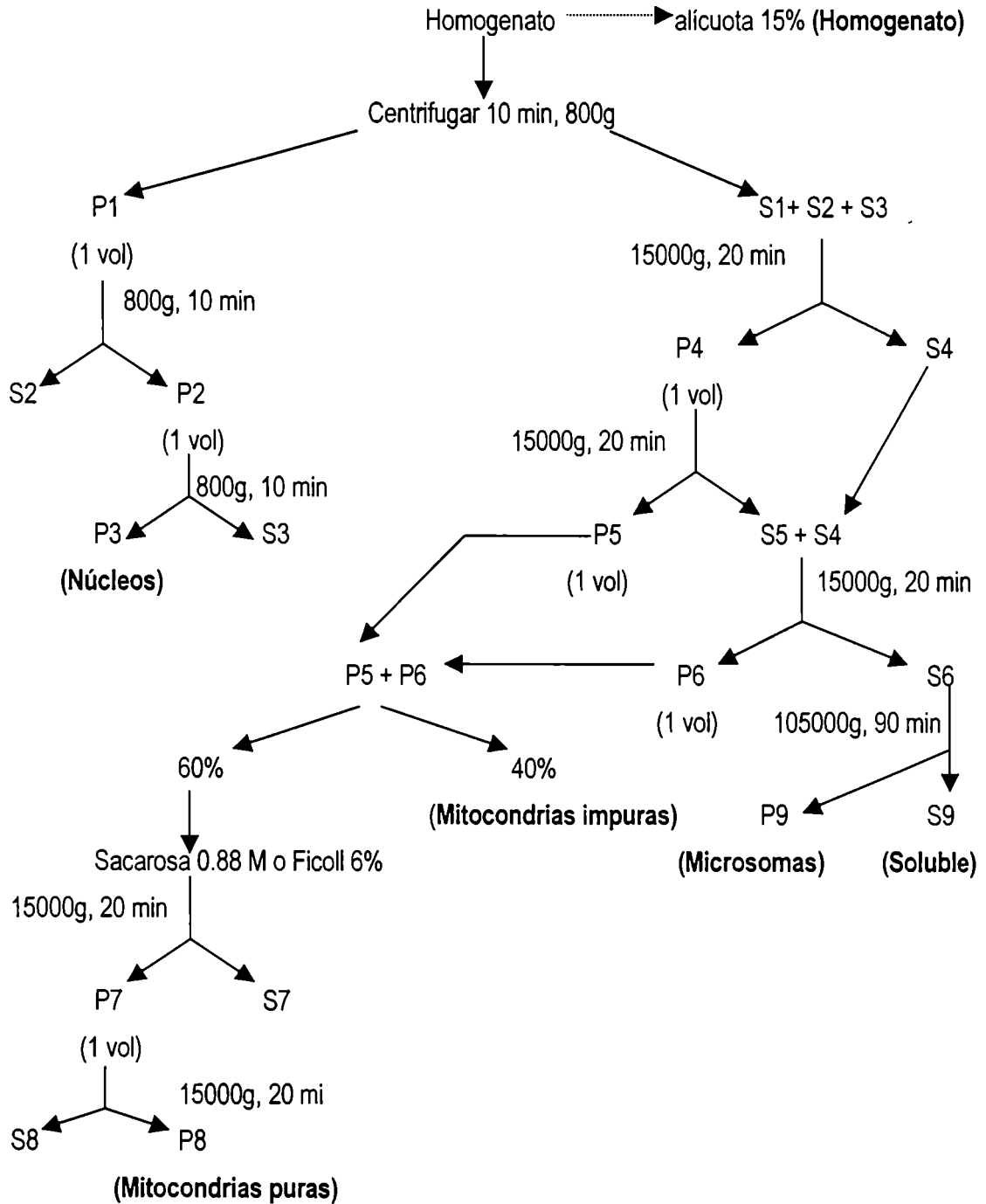
Glucosa 6-fosfatasa para la fracción microsomal.

La concentración de proteínas de cada fracción se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

El esquema completo puede verse en la figura 3.

Figura 3. Protocolo de fraccionamiento subcelular.

Homogeneizar en una relación de 250 mg de tejido/ml de buffer T (1 volúmen)



Nota: Esquema del fraccionamiento subcelular llevado a cabo en interrenales de sapo, rata y pollo. P: pellet; S: sobrenadante. Vol: volúmen.

Preparación de fracciones submitocondriales

Las fracciones submitocondriales se obtuvieron a partir de las mitocondrias purificadas por el método de Schmitman (Schmitman y col., 1967). Las fracciones mitocondriales purificadas se resuspendieron en buffer Hepes 2 mM, manitol 220 mM, sacarosa 0.25 M, BSA 0.5% (Hepes-S), pH 7.2 en una relación de 1mg de proteínas por ml de buffer. A dicha suspensión se le agregaron 1.6 ml de una solución de digitonina 0.5% en buffer Hepes-S y la suspensión final se mantuvo durante 20 min a 4°C con agitación. Una vez finalizado ese período se le agregaron 4 ml de buffer Hepes-S frío y se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos. El pellet obtenido corresponde a los mitoplastos (T, membrana interna y matriz mitocondrial) mientras que en el sobrenadante se encuentran las membranas externas (E). La fracción E fue centrifugada a 105.000 g durante 60 minutos. Las fracciones obtenidas fueron E, en el pellet, mientras que en el sobrenadante se encuentra el material proveniente del espacio intermembranoso (I). Sobre cada una de las fracciones obtenidas se midieron los siguientes marcadores:

- SDH, para membrana interna mitocondrial
- Monoamina oxidasa (MAO), para membrana externa mitocondrial
- Adenilato quinasa (AQ), para el espacio intermembrana

Determinación de la actividad de enzimas marcadoras

➤ *Succinico deshidrogenasa*. La actividad de esta enzima se determinó por el método de Pennington (Pennington, 1961). Cada una de las fracciones subcelulares o submitocondriales se incubaron durante 15 minutos a 37°C con la siguiente mezcla de reacción: succinato de sodio 50 mM, sacarosa 25 mM y violeta de p-nitrotetrazolio (INT) 0.1%, en un volumen final de 1 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7.4. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por el agregado de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A continuación, se agregaron 4 ml de acetato de etilo con el objeto de extraer el producto coloreado formado, cuya absorbancia se determinó a 490 nm, contra un blanco preparado en ausencia de succinato de sodio. Una unidad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima que produce una variación de absorbancia de 0.01 en las condiciones del ensayo.

➤ *Monoamina oxidasa*. La actividad de esta enzima se midió de acuerdo al método de Johnston (Johnston, 1968). Para ello se incubaron 60 nmoles de serotonina-C¹⁴ (Ae=56.3 mCi/mmol) en presencia de cada una de las fracciones submitocondriales, y en un volumen final

de 4 ml de buffer fosfato 10mM. La reacción se detuvo por el agregado de 0.2 ml de HCl 2 N y los productos formados se extrajeron con 2 ml de acetato de etilo. La radiactividad del extracto orgánico fue una medida de la actividad enzimática de cada fracción. El blanco de reacción carecía de la fracción proteica. Se definió una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que transforma 1000 dpm de serotonina-C¹⁴.

➤ *Adenilato quinasa*. Su actividad se determinó por el método de Schmitman y Greenawalt (1968). El método consiste en seguir espectrofotométricamente la conversión de ADP (adenosina difosfato) a ATP y AMP (adenosina monofosfato), acoplado a la formación de ATP a la reducción de NADP⁺ con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía: 0.75 mM NADP⁺, 15 mM de glucosa, 10 UI de hexoquinasa, 0.4 UI de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 0.45 mM de KCN (cianuro de potasio) y 5 mM de cloruro de magnesio, en buffer glicil-glicina 70 mM, pH 8.0. Luego de preincubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron las fracciones submitocondriales, comenzándose a registrar el aumento en el tiempo de la absorbancia a 340 nm (formación de NADPH). El blanco de reacción no tenía ADP. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.001 unidades de absorbancia por segundo.

➤ *Glucosa-6-fosfatasa*. La actividad de esta enzima se determinó por el método de Aronson y Touster (1973). A cada una de las fracciones subcelulares (50 µg de proteínas en 50 µl) se les agregaron 450 µl de un reactivo que estaba formado por glucosa-6-fosfato 20 mM, EDTA 5 mM e histidina 35 mM, pH 7.0. Luego de 20 minutos de incubación, la reacción se detuvo por el agregado de 25 µl de TCA 50%. Para la determinación de fosfatos libres se utilizó la técnica de Ames (Ames, 1966). Las muestras obtenidas de la incubación anterior se trataron con una mezcla de reacción que contenía 1% de ácido ascórbico, 0.7% de molibdato de amonio y 0.6 N de HCl. La reacción se dejó transcurrir durante 20 minutos a 45°C. Pasado ese tiempo la concentración de fosfatos se determinó espectrofotométricamente a 660 nm. La cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva de calibración construida con distintas concentraciones de fosfatos, en un rango entre 0 y 80 mM.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 3β-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA-ISOMERASA (3βHSD/I)

Para estos experimentos se utilizaron interrenales de sapo y con fines comparativos se realizaron algunos experimentos de localización subcelular con adrenales de rata y pollo.

La actividad de la enzima 3β HSD/I fue medida por la conversión de pregnenolona- H^3 a progesterona- H^3 y del análogo de aldosterona en aldosterona.

La formación de progesterona fue cuantificada por el método de digitonina (Berko y col., 1987) modificado por mí. El método consiste en frenar la reacción en el momento indicado con el agregado de 1 ml de pregnenolona radioinerte (2mg/ml en etanol) que contenía además 10.000 dpm de progesterona- C^{14} como marcador de pérdidas. Del volumen final de 2 ml se toma una alícuota equivalente al 10% con el objeto de medir la relación H^3/C^{14} inicial. Una vez tomada la alícuota se agrega un volumen equivalente (1,8 ml) de digitonina 1% preparada en etanol 50%. La mezcla se agita y se deja reposar 1 h a temperatura ambiente después de lo cual se centrifuga a 5.000 g por 20 minutos. En el precipitado se encuentra la pregnenolona mientras que en el sobrenadante permanece la progesterona. Del sobrenadante se toma nuevamente una alícuota de 200 μ l para medir la relación H^3/C^{14} . Este método, descrito originalmente para colesterol, se basa en la formación de digitónidos que se obtienen por la derivatización del esteroide en el -OH de la posición C- 3β (pregnenolona en nuestro caso). El método fue validado por comparación de los resultados obtenidos al cuantificar la formación de progesterona por digitonina con aquellos obtenidos cuando la cuantificación se lleva a cabo purificando progesterona por TLC (cromatografía en capa delgada) bidimensional, utilizando benceno:etanol (95:5) como solvente de corrida para la primera dimensión y cloroformo:acetona:etanol (84:15:1) para la segunda dimensión. Se utilizó como criterio de pureza de la fracción la constancia en la relación H^3/C^{14} en los distintos pasos de purificación.

La formación de aldosterona a partir del análogo de aldosterona fue cuantificada de manera similar. La pureza de aldosterona fue confirmada utilizando cromatografía líquida de alta presión (metanol:agua, 80:20, flujo 1 ml por min) y aldosterona- C^{14} como marcador. Se utilizó también TLC (Acetato de etilo:benceno:metanol, 105:45:15). Este sistema permite separar aldosterona de su análogo 3β -ol (Rf análogo= 0,47, Rf aldosterona= 0,68).

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml utilizando buffer T con NAD^+ 0,5 mM salvo que se especifique lo contrario. La reacción se inicia por el agregado de 10 μ l de sustrato en etanol (50 μ M de pregnenolona, A.e.= 1 mCi/mmol ó bien 30 μ M del análogo de aldosterona). La concentración final de etanol, 0,1% no afecta la actividad enzimática. Esto se concluye al comparar la actividad medida en estas condiciones con la que se obtiene al agregar el sustrato de la siguiente manera: se agrega el sustrato en etanol en el tubo de incubación, se agrega una gota de propilenglicol y se evapora el etanol bajo presión de nitrógeno de manera

que el esteroide quede disuelto en el propilenglicol. Después de este procedimiento, el sustrato se preincuba durante 15 min con buffer T después de lo cual se inicia la reacción por el agregado de NAD⁺ y de la fracción enzimática correspondiente.

El blanco de ensayo se obtiene incubando el sustrato solo en buffer T con NAD⁺ o bien con la fuente de enzima previamente hervida por 15 min a 100°C. No se detectaron diferencias apreciables entre ambos procedimientos.

Localización subcelular de la actividad de 3βHSD

La cantidad de enzima utilizada en cada punto fue de 50 μg de proteínas y las incubaciones se llevaron a cabo durante 20 min a 28°C. La cantidad de enzima utilizada así como el tiempo de incubación se determinaron en experimentos previos y garantizan que las mediciones de actividad se lleven a cabo en condiciones de saturación. La actividad se midió sobre todas las fracciones obtenidas durante el fraccionamiento subcelular, a saber: homogenato, nucleos, mitocondrias impuras, mitocondrias purificadas, microsomas y soluble.

Requerimiento de cofactores de la actividad de 3βHSD

Se midió la actividad de la 3βHSD en presencia de distintos cofactores. Para ello se realizaron incubaciones con 50 mg de homogenato durante 20 min, utilizando una concentración de 50 mM de pregnenolona-H³. Los cofactores utilizados fueron: NAD⁺, NADH, NADP⁺ y NADPH en una concentración de 0.5 mM. También se utilizó un sistema regenerante de NADPH que consistió en el agregado de NADP⁺ (0.5 mM) y malato (5 mM).

Estudios de inhibición de la actividad de 3βHSD

Se realizaron estudios de inhibición de la actividad de la 3βHSD. Para ello se utilizaron distintos inhibidores tales como cianocetona (10⁻⁶ M - 10⁻⁴ M) y algunos esteroides que pueden provocar inhibición por producto tales como progesterona. Sobre cada fracción en la que se midió actividad enzimática se analizó el efecto del agregado de pregnenolona, analogo de aldosterona y progesterona.

Cálculo de las constantes cinéticas de la enzima 3βHSD

Se calcularon las constantes cinéticas de la enzima de localización mitocondrial y microsomal. Los sustratos seleccionados a tal efecto fueron pregnenolona (entre 0,1 y 30 μM) y analogo de aldosterona (0,1 y 30 μM). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min y con

una concentración de 0,5 mM de NAD⁺. Los resultados obtenidos se linealizaron por Lineweaver-Burk y se obtuvieron los valores de K_m ap y V_{max} ap.

Se analizaron también las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) para el cofactor NAD⁺. Para ello se utilizó una concentración fija del sustrato pregnenolona (50 μ M) y cantidades variables del cofactor (entre 1 y 100 mM).

RADIOINMUNOANÁLISIS

Tanto la cuantificación de aldosterona y corticosterona plasmáticas, como la obtenida en incubaciones de adrenales se llevó a cabo utilizando la técnica de radioinmuno análisis. Las determinaciones se realizaron por duplicado en tubos de polipropileno, en un volumen final de 200 μ l de buffer borato de sodio 0.1 M, pH 8.0. El medio contenía también 1% de seroalbumina bovina, fracción V y 0.2% de inmunoglobulina G. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes del esteroide a dosar. Los esteroides se hallaban disueltos en buffer borato, pH 8.0, que contenía también 5% de etanol. La unión no específica se determinó incubando el marcador radioactivo (³H) en ausencia de anticuerpo. La reacción se llevó a cabo durante 18 hs a 4°C y se interrumpió por el agregado de carbón-dextrano en una proporción de xxx a xx. Los tubos se centrifugaron a 2500g durante 20 minutos en centrifuga refrigerada. De los sobrenadantes obtenidos, que contenían el esteroide unido al anticuerpo, se tomaron 200 μ l que se colocaron en viales para la determinación de la radioactividad unida.

RIA de aldosterona: la curva de calibración abarcó un rango entre 2.5 y 150 pg. Se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de un hibridoma de ratón, en una dilución de 1/2500 (Gomez-Sanchez y col., 1987). Se utilizaron 5000 dpm del marcador radioactivo ((1,2-³H(N)-aldosterona) que poseía una actividad específica de 40-60 μ Ci/mmol.

RIA de corticosterona: la curva de calibración abarcó un rango entre 20 pg y 10 ng. Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en oveja, en una dilución de 1/5000 (Gomez-Sanchez y col., 1975). Se utilizaron 5000 dpm del marcador radioactivo (1,2-³H(N)-corticosterona) que tenía una actividad específica de 40-60 μ Ci/mmol.

Calculo de la masa de esteroides: Una vez obtenido los valores del esteroide unido, la masa de esteroides se calculó mediante un programa de computación (Munson y col., 1989) que ajusta los valores obtenidos a partir de la curva de calibración. Para ello utiliza 4 coeficientes que calcula por iteración, a saber:

A: la máxima cantidad de esteroide unido; B: la pendiente de la curva en el punto de inflexión;
C: la concentración efectiva 50 y D: la unión no específica.

Una vez determinados dichos parámetros, la masa del esteroide presente en las muestras (X) se calcula despejando la variable de la siguiente función:

$$Y = \frac{A - D}{1 + \frac{XB}{C}} + D$$

Los resultados fueron expresados de acuerdo al origen de las muestras. Cuando estas provenían de plasma, se expresaron como masa del esteroide/ml de plasma; cuando provenían de incubaciones de tejido, como masa del esteroide/mg de proteínas.

La determinación de esteroides plasmáticos se llevó a cabo luego de la extracción de los esteroides. Para ello las muestras de plasma fueron extraídas 3 veces con 3 volúmenes de éter. Los extractos orgánicos se evaporaron hasta sequedad bajo N₂ y se resuspendieron en buffer para RIA. Las pérdidas durante la extracción fueron evaluadas en tubos separados, después del agregado de aldosterona-H³. La recuperación de la radioactividad después de las extracciones fue del 95%.

MEDICIÓN DE LA RADIATIVIDAD

Para la medición de radiactividad en las alícuotas provenientes de las distintas fracciones, las muestras se pipetearon en viales de bajo contenido de potasio y se evaporó el solvente hasta sequedad bajo corriente de aire. Los residuos así obtenidos se disolvieron en 10 ml de líquido centellador de la siguiente composición: solución en tolueno de 0,4% p/v de PPO (2,5-difeniloxazol) y 0,025% p/v de dimetil POPOP [1,4-bis-2-(4-metil-5-feriloxazolil) benceno].

Las muestras así preparadas se contaron en un Contador de Centelleo Líquido Tracer Analytic, modelo MARK III conectado a una terminal ITT, con corrección automática de "quenching". Este equipo consigue establecer ganancias y discriminaciones de grillas óptimas para la medición de estructuras marcadas con dos isótopos distintos por lo cual es posible llegar a relaciones de isótopos constantes en los últimos pasos de purificación.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de todos los experimentos llevados a cabo en la presente tesis fueron analizados estadísticamente utilizando Análisis de Varianza de uno o dos factores. En los casos

en los que fue posible se determinaron tanto las interacciones como los posibles contrastes entre las distintas condiciones.

Debido a que algunos resultados obtenidos se hallaban expresados como porcentajes de conversión de la radiactividad total utilizada, se hizo necesario homogeneizar la varianza. Para ello, antes de su análisis, cada valor individual fue transformado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V_{ij} = \text{arc sen } \sqrt{Y_{ij}/100}$$

en la cual Y_{ij} corresponde a cada uno de los porcentajes obtenidos en las distintas condiciones (Sokal y Rohlf, 1969).

..... Resultados y Discusión.....

RESULTADOS Y DISCUSION

BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA

La biosíntesis de aldosterona y su regulación son procesos críticos en todas las especies y en particular en los anfibios debido a la importancia que tiene la retención de sodio en los animales de ambiente terrestre. Esto nos llevó a estudiar los pasos que conducen a la biosíntesis de este mineralocorticoide así como sus variaciones estacionales.

A pesar de todos los avances que se han producido en el conocimiento de la biosíntesis de esteroides, el último paso de la aldosteronogénesis no ha sido aún totalmente clarificado, ni siquiera en mamíferos. En adrenales de rata (Fraser y Lantos, 1978), la 18-OH-B ha sido descrita como el precursor mas probable para la biosíntesis de aldosterona en la llamada vía delta cuatro (ver Fig. 2). En nuestro laboratorio se demostró que este esteroide puede originar aldosterona cuando se lo utiliza como precursor, no en su forma original "M", sino transformado en una forma menos polar (L) cuyo $R_s(s=18\text{-OH-B "M"})$ en el sistema Bush B5 es 4.33 (Aragónés y col., 1975; Cozza y col., 1985, 1987). La forma original de la hormona posee muy baja capacidad precursora del mineralocorticoide.

La transformación de 18-OH-B en su forma menos polar se consigue espontáneamente en medio ácido a partir de pH 4. Si bien este pH parece ser no fisiológico, desde un punto de vista clásico, conviene recordar los trabajos de Maggio (Maggio, 1994) de los cuales se desprende que dependiendo de la composición lipídica de las membranas (y las enzimas esteroideogénicas son en su mayoría de membrana) en la interfase pueden encontrarse valores de pH muy bajos (cercaos a 4).

Desde otro punto de vista, 18-OH-B puede obtenerse en forma abundante a partir de corticosterona, cuando se utiliza como fuente de enzimas tejido adrenal de rata (Lantos y col., 1987). A diferencia de esto, hemos visto (ver Introducción) que en el sapo, la 18-OH-B se biosintetiza fundamentalmente a partir de pregnenolona a 28°C y no de progesterona ni de corticosterona. Por otra parte (es conveniente insistir) aquel esteroide es, en todas las especies estudiadas hasta el momento, el sustrato inmediato mas probable de la aldosterona (Fraser y Lantos, 1978), si bien en estos días se continúa estudiando la forma precursora óptima del compuesto 18-hidroxilado.

En anfibios en general y en el sapo en particular no solo existen muy pocos trabajos en la literatura acerca de la capacidad precursora de 18-OH-B sino que no se ha planteado siquiera el tema de la baja precursoriedad de la hormona.

A partir de lo expuesto, y dado que su biosíntesis a partir de pregnenolona es muy abundante (Ceballos y *col.*, 1983), es que se decidieron estudiar algunas características químicas de la 18-OH-B de sapo y su capacidad precursora de aldosterona.

Todos los experimentos en los cuales se utilizó 18-OH-B de sapo tanto en su forma "M" ó como su derivado menos polar "L" involucraron la biosíntesis previa del esteroide, utilizandose para ello las condiciones óptimas mencionadas en Materiales y Métodos.

CARACTERISTICAS QUIMICAS Y PROPIEDADES BIOSINTETICAS DE LA 18-
HIDROXICORTICOSTERONA (18-OH-B) DE SAPO

CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA 18-OH-B DE SAPO

➤ Tratamiento en medio ácido

En base a lo anterior se decidió analizar la capacidad de la 18-OH-B de sapo de transformarse en formas menos polares. Para ello, la hormona biosintética se sometió a tratamiento en medio ácido (pH 2) en forma paralela a la misma hormona de origen comercial. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 4.

Tabla 4

Formas menos polares obtenidas a partir de la 18-OH-B comercial y biosintética.

Origen	18-OH-B "M"	Formas menos polares			
Comercial					
Rf	0.12	0.55	0.63	0.75	0.92
Rs	1.0	4.33	5.26	6.33	7.18
%	10	82.8	4.00	2.00	1.20
Sapo					
Rf	0.13	0.40			
Rs	1.00	3.10			
%	5.2	94.8			

Nota: Rf, Rs(s =18-OH-B "M") y porcentajes (%) de las distintas formas menos polares obtenidas al suspender la hormona comercial y de sapo en CIH 10⁻² N. Las muestras se cromatografiaron en el sistema Bush B₅ tal cual lo indicado en Materiales y Métodos.

La forma comercial de la hormona se transforma en 4 derivados menos polares de las cuales la de Rf = 0.55 es la mayoritaria. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Cozza y col. (1985), quienes a su vez encontraron que podía obtenerse la forma mayoritaria utilizando pHs alrededor de 5.5-6.2, pHs posibles de alcanzar en las cercanías de las membranas

intracelulares dependiendo de la composición lipídica de las mismas (Maggio, 1994).

A diferencia de lo que ocurre con la hormona comercial, la proveniente de interrenales de sapo, presenta una forma menos polar única y distinta de las conocidas hasta el momento. La forma obtenida posee un $R_f=0.40$. Este hecho es sumamente curioso por cuanto debería esperarse que la hormona (dado que es aparentemente la misma) tuviera un comportamiento similar al de la forma comercial. Hasta el momento no se han podido explicar estas diferencias en el comportamiento de la hormona de sapo.

➤ Estudios de reversión

Se estudió también la capacidad de reversión que tenía la forma menos polar de la 18-OH-B de sapo en medio alcalino, durante distintos tiempos. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 5.

Tabla 5
Estudios de reversión de la forma "L" de sapo en medio alcalino.

Tratamiento	Tiempo	% R_f 0.40	% R_f 0.13
NH_4^+ 0.05%	12 hs	68	32
NH_4^+ 0.05%	24 hs	30	70
NH_4^+ 0.05%	7 días	0	100

Nota: El tratamiento en medio alcalino se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. NH_4^+ : amoníaco en solución acuosa. Finalizados los tratamientos, se extrajeron los esteroides y se procesaron de la manera habitual.

La capacidad de reversión de la 18-OH-B "L" de sapo es total al cabo de 7 días en medio alcalino. Dado que en ese tiempo la reversión fue total, no se incluyeron los resultados obtenidos luego de 15 días de tratamiento. Dado que su reversión es total en medio alcalino se descarta que la forma menos polar sea un ester de 18-OH-B.

PROPIEDADES BIOSINTÉTICAS DE 18-OH-B

Como ya se mencionó en la Introducción esta hormona se biosintetiza en el sapo

fundamentalmente a partir de pregnenolona y no de progesterona ni corticosterona. Por otro lado, como ya se dijera, la 18-OH-B es, desde un punto de vista teórico, el precursor inmediato más probable para la biosíntesis de aldosterona (Fraser y Lantos, 1978). Por esto se decidió estudiar la capacidad biosintética de aldosterona tanto de la forma "M" como de las formas menos polares "L", utilizando a tal efecto la hormona comercial y la sintetizada por interrenales de sapo.

Las Tablas 6 y 7 muestran los resultados obtenidos en cada caso. Como puede verse, ninguna de las formas de 18-OH-B, independientemente de su origen, son buenas precursoras para la biosíntesis de aldosterona. Los porcentajes de transformación obtenidos no difieren significativamente entre las incubaciones llevadas a cabo con y sin enzima, a diferencia de lo que ocurre en adrenales de rata. En estas últimas la forma L4.33, $R_f=0.55$, [caracterizada por Cozza y col. (1985) como 18-desoxialdosterona] es un buen precursor para la síntesis de aldosterona.

Tabla 6

Biosíntesis de aldosterona a partir de 18-OH-B formas "M" y "L" de sapo en tejido interrenal de sapos de primavera-verano.

Precursor	Tejido	% Aldo	% forma "M"	% forma "L"
"M"	+	0.90 ± 0.10	97.0 ± 6.10	–
"M"		0.87 ± 0.11	98.0 ± 5.80	–
"L"	+	0.83 ± 0.10	12.0 ± 1.1	84.0 ± 3.9
"L"	-	0.92 ± 0.09	16.0 ± 1.3	82.0 ± 3.7

Nota: Porcentajes de producción de aldosterona (%Aldo) a partir de 18-OH-B de sapo en su forma original (M) y su forma menos polar (L3). Se muestran también los porcentajes remanentes de los precursores utilizados, 18-OH-B "M" (%M) y 18-OH-B "L" (%L). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 60 min., utilizando como fuente de enzima tejido interrenal de sapo. Para más detalles ver Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media de 6 experimentos \pm el error standard.

Tabla 7

Biosíntesis de aldosterona a partir de las formas "M" y "L" de origen comercial en tejido interrenal de sapos de primavera-verano.

Precursor	Tejido	% Aldo	% forma "M"	% forma "L4.33"
"M"	+	0.87 ± 0.12	93.0 ± 4.50	–
"M"		0.80 ± 0.16	94.2 ± 3.80	–
"L"	+	0.72 ± 0.15	25.0 ± 2.1	72.0 ± 2.2
"L"	-	0.76 ± 0.11	23.5 ± 1.6	74.6 ± 4.8

Nota: Porcentajes de transformación en aldosterona (%Aldo) de 18-OH-B comercial en su forma M y su forma menos polar mas abundante L4.33. %M: porcentaje de 18-OH-B "M" remanente; %L4.33: porcentaje de la forma L4.33 sin convertir. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 60 minutos y la fuente de enzima fue tejido interrenal de sapo. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.. Los resultados estan expresados como la media de 6 experimentos ± el error standard.

Los experimentos se realizaron con tejido proveniente de animales de primavera-verano (Tablas 6 y 7) y de otoño-invierno (datos no mostrados). En ambos periodos los resultados obtenidos fueron similares. Ésto difiere de lo obtenido por Nicolis y Ulick (1965) para *Rana catesbeiana*, quienes encontraron una pequeña transformación de 18-OH-B en aldosterona en presencia de tejido, la cual era significativa respecto del control sin tejido interrenal.

Si bien las Tablas 6 y 7 muestran los valores obtenidos luego de 60 minutos de incubación, resultados similares se obtuvieron luego de 120 minutos de incubación (datos no mostrados).

Los experimentos mostrados hasta aquí, permitirían en principio descartar a esta hormona como intermediario para la biosíntesis de aldosterona en la glándula interrenal de *Bufo arenarum*, por lo menos en las condiciones utilizadas para los experimentos presentados en esta Tesis. Esto podría deberse, tal vez, no solo a la baja precursoridad que en general tiene 18-OH-B, sino también a que la vía $\Delta 4$ no es un camino de síntesis predominante en la formación de aldosterona en esta especie. Recordemos que ya fue descrita la baja precursoridad de corticosterona en interrenales de sapo (Ceballos y col., 1992).

CARACTERIZACION DEL COMPUESTO "N"

Como ya se detalló en la Introducción, el compuesto "N" se obtuvo por primera vez incubando cortes de tejido interrenal de *B. arenarum* a 28°C y a partir de pregnenolona-H³ como precursor. Todos los experimentos que se llevaron a cabo con este esteroide requirieron de la biosíntesis y la purificación parcial previa del mismo. Para ello se utilizaron las condiciones óptimas descritas en Materiales y Métodos (tomadas de Ceballos y col., 1983).

PROPIEDADES CROMATOGRAFICAS DE "N"

➤ Movilidades absolutas y relativas del compuesto "N" en distintos sistemas cromatográficos.

La Tabla 8, muestra un resumen de las movilidades absolutas y relativas de "N" en distintos sistemas cromatográficos. Como puede verse se trata de un esteroide muy polar, con movilidad intermedia entre 18-OH-B y cortisol en el sistema Bush B5, descartándose que se tratara de cortisol, esteroide, que como ya se mencionara (Ceballos y col., 1983), esta especie no produce.

Tabla 8

Características cromatográficas de "N"

Sistema cromatográfico		Características
Papel	Bush B5	Rf= 0.21
	Bush B5	Rs (s = 18OHB) = 1.6
	Bush B5	Rs (s = F) = 0.84
	Bush B5	Rs (s = aldo) = 0.70
	Cy:Di I	Rf = 0.14
	Cy:Di I	Rs (s = F) = 0.57
TLC	Sistema A	Rf = 0.47
	Sistema A	Rs (s = aldo) = 0.82
HPLC	Metanol:agua (80:20)	Tr = 7.5 min

Nota: 18OHB=18-hidroxicorticosterona; F=cortisol; Aldo=aldosterona; Cy:DiI= Ciclohexano: Dioxano:Metanol:agua (4:4:2:1); Sistema A=Acetato de Etilo:Benceno:Metanol (105:45:15); HPLC= Columna μ Bondapak C-18, flujo 1 ml/min. Para mas detalles ver Materiales y Metodos.

➤ Compuesto "N" y 19-hidroxicorticoesterona (19-OH-B)

El esteroide "N", ligeramente mas polar que cortisol en los sistemas cromatográficos Bush B₅ y Cy:Di I, co-migra con 19-OH-B radioinerte en esos mismos sistemas (Tabla 9). Sin embargo, luego de ser acetilado y cromatografiado en el sistema Bush A, el acetato de "N" da lugar a un pico de Rf 0.24 mientras que el acetato de 19-OH-B tiene un Rf de 0.14, indicando que se trata de compuestos distintos. Se descartó de esta manera que el compuesto "N" fuera 19-OH-B, esteroide cuya presencia fuera descripta por primera vez para adrenal bovina (Neher, 1963)

Tabla 9

Comparación de las movilidades cromatográficas de "N" y 19-OH-B

Sistema cromatográfico	Derivado	Características
Bush B ₅	Ninguno	Rs (s=19OHB)= 1.00
Cy:Di I	Ninguno	Rs (s=19OHB)= 1.00
Bush A	Acetato "N"	Rf = 0.24
Bush A	Acetato 19OHB	Rf = 0.11

Nota: 19-OH-B= 19-hidroxicorticoesterona. Condiciones de acetilación: 20 hs. a 30°C. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

PROPIEDADES QUIMICAS DEL COMPUESTO "N".

➤ Tratamiento en medio ácido.

Para descartar la posibilidad de que "N" sea una forma particular de 18-OH-B, o bien de otro esteroide 18 hidroxilado, el mismo fué tratado en medio ácido de acuerdo con Aragonés y col. (1975) paralelamente a un standard radiactivo de 18-OH-B. Como puede verse en la Tabla 10, el compuesto "N" conserva su movilidad original, sin que se registre la presencia de ninguna forma menos polar, característica de los esteroides 18 hidroxilados (Lantos y col., 1987). El standard radiactivo de 18-OH-B se transforma en su forma menos polar predominante (Cozza y col., 1985). A partir de estos resultados puede concluirse que "N" no se trata de una forma particular de 18-OH-B ni de otro esteroide con un hidroxilo en la posición C-18 como 18-hidroxi-11β

desoxicorticosterona.

➤ Tratamiento en medio alcalino.

Se sabe que algunas formas menos polares de los esteroides 18 hidroxilados tienen la capacidad de revertir a su forma "M" en medio alcalino (Lantos y col., 1987). Con el objeto de establecer si "N" era una forma menos polar de 18-OH-B (aunque poco probable dado su movilidad), se sometió a un tratamiento en medio alcalino durante distintos tiempos y, paralelamente a la forma menos polar mayoritaria de 18-OH-B obtenida en el punto anterior. Como se desprende de la Tabla 10, el comportamiento cromatográfico del compuesto "N" no sufrió modificaciones a diferencia de la forma menos polar de 18-OH-B que revirtió a su forma "M", concluyéndose que "N" no es una forma menos polar de 18-OH-B.

Tabla 10

Tratamiento de "N" en medios ácidos y alcalinos

Compuesto	Rf inicial	Sistema	Tratamiento	Rf final
18OHB	0.13	Bush B5	CIH 10-2 N, 2 min	0.56
"N"	0.21	Bush B5	CIH 10-2 N, 2 min	0.21
18OHB(L)	0.56	Bush B5	NH4+ 0.05% 1 día	0.13
"N"	0.21	Bush B5	NH4+ 0.05% 1 día	0.21
"N"	0.21	Bush B5	NH4+ 0.05% 7 días	0.21

Nota: L= forma menos polar de 18-OH-B comercial. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

➤ Saponificación

Algunos esteroides pueden hallarse presentes en los tejidos como formas esterificadas (Cozza, y col., 1985). A pesar de que esta propiedad les confiere baja polaridad (característica que no posee "N") este compuesto fue saponificado paralelamente con el acetato de desoxicorticosterona (DOCA). Mientras que el tratamiento transformó a DOCA en su forma no esterificada, la movilidad de "N" en el sistema Bush B5 no presentó ninguna modificación (datos no mostrados). De esta manera, se descartó "N" fuera un esteroide esterificado.

➤ Acetilación del compuesto "N"

Como ya se mencionara, el compuesto "N" acetilado durante 20 hs. a 30°C da lugar a un único pico de Rf 0.24 en el sistema Bush A (Tabla 9). Con el objeto de obtener mayor información acerca de su estructura química, se lo acetiló en condiciones variables y en forma simultanea con esteroides conocidos. Las condiciones de acetilación y los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 11.

Tabla 11

Acetilación de "N" en distintas condiciones.

Condición	Sistema cromatográfico	Esteroides derivatizado	Rf
Sin acetilar	Papel: Bush B1	"N"	0.06
	Papel: Bush B1	5-HAA	0.06
	TLC: Sistema B	Pregnenolona	0.16
	Papel: Bush A	Desoxicorticosterona	0.22
6 hs, 20°C	Papel: Bush B1	"N"	0.06 y 0.22
	Papel: Bush B1	5-HAA	0.06 y 0.22
	TLC: Sistema B	Pregnenolona	0.76
	Papel: Bush A	Desoxicorticosterona	0.22
15 hs 30°C	Papel: Bush B1	"N"	0.06, 0.44 y 1.00
	Papel: Bush B1	5-HAA	0.06, 0.44 y 1.00
	Papel: Cy:Di I	Aldosterona	0.52 y 0.76
	Papel: Bush A	Desoxicorticosterona	0.64
20 hs 30°C	Papel: Bush B1	"N"	1.00
	Papel: Bush A	5-HAA	0.24
	Papel: Bush A	"N"	0.24
	Papel: Cy:Di I	Aldosterona	0.76

Nota: Sistema B= Benceno:Etanol (95:5); DOC=11-desoxicorticosterona; 5-HAA: 3β-hidroxi análogo de aldosterona. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

Cuando la acetilación se llevó a cabo durante 6 hs a temperatura ambiente y se analizaron los productos formados en el sistema Bush B1, se obtuvieron dos picos de radiactividad: uno minoritario, correspondiente a la forma sin acetilar y otro a una forma parcialmente acetilada. No se detectó radiactividad en el frente de corrida, zona de migración en este sistema, del compuesto completamente acetilado. En estas condiciones no se acetila el compuesto 11-desoxicorticosterona, que posee solo un hidroxilo en la posición C-21, y sí se acetila completamente pregnenolona que tiene un hidroxilo en C-3.

Si en lugar de 6 hs a temperatura ambiente, la reacción de acetilación se realiza durante 15 hs a 30°C, se obtienen 3 picos de radiactividad en el sistema Bush B1, uno que corresponde al esteroide sin acetilar, otro a la forma completamente acetilada (que como ya se dijera en este sistema migra con el frente de corrida) y una tercera forma parcialmente acetilada distinta de la obtenida en la condición anterior. En esta condición de acetilación DOC se acetila completamente en tanto que aldosterona lo hace parcialmente dando lugar al mono y diacetato.

Como ya fuera mencionado, si la acetilación se realiza durante 20 hs a 30 C el compuesto "N" se acetila completamente dando lugar a un único pico de radiactividad, lo mismo ocurre con aldosterona.

De los resultados aquí expuestos podría concluirse que :

1. el compuesto "N" parece poseer por lo menos tres sitios susceptibles de ser acetilados
2. los sitios mencionados poseerían distinta accesibilidad y
3. uno de ellos parecería estar ubicado en la posición C3 (con alto grado de exposición), tal cual surge de los resultados obtenidos al acetilar durante 6 hs a temperatura ambiente.

PROPIEDADES BIOSINTETICAS DEL COMPUESTO "N"

En esta etapa, con la estructura de "N" aún desconocida, se llevaron a cabo experimentos preliminares para estudiar su capacidad biosintética. Para ello el esteroide radiactivo obtenido por biosíntesis se incubó, durante distintos tiempos, con y sin tejido interrenal proveniente de animales de primavera-verano. Como puede verse en la Tabla 12, el compuesto "N" es un muy buen precursor para la síntesis de aldosterona. Esta transformación depende de la presencia de tejido interrenal y del tiempo de incubación. La conversión aparente de "N" a aldosterona en ausencia de tejido es muy baja e independiente del tiempo de incubación. Por otra parte, en el

sistema Bush B5 en el que fueron originalmente procesados los productos de la incubación, no fue posible encontrar ningún otro esteroide distinto de aldosterona.

Tabla 12

Biosíntesis de aldosterona a partir de "N"-H³

Tejido (50 mg)	Tiempo (min)	Aldosterona (%)
Si	30	3.47 ± 0.80
No	30	0.32 ± 0.12
Si	60	6.38 ± 0.90
No	60	0.34 ± 0.10
Si	90	12.60 ± 2.10
No	90	0.41 ± 0.16
Si	120	13.50 ± 2.20
No	120	0.37 ± 0.16

Nota: Los resultados están expresados como la media de los porcentajes de aldosterona producida en 8 experimentos por duplicado ± error standard.

Ademas, como puede verse en la Tabla 13, la aldosterona biosintetizada a partir de "N" parece ser de alta pureza ya que la relación H³/C¹⁴ se mantiene constante a partir del primer paso de purificación.

Tabla 13

Relaciones H³/C¹⁴ durante la purificación de aldosterona.

	Inicial	Aldo-like	Aldo-Ac	Lac1	Lac2
Compuesto "N"	38.05	8.61	8.39	8.32	8.64
Compuesto "N"	25.34	6.72	6.87	6.90	6.68

Nota: Los resultados muestran 2 experimentos típicos en los cuales se utilizó "N" como sustrato. Ac.= acetato; 1Lac= primera lactona de aldosterona; 2Lac= segunda lactona.

INCUBACION DEL COMPUESTO "N" CON LA ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA COMERCIAL

La enzima proveniente de Sigma Chem. Co. utilizada para estos experimentos se obtiene a partir de *Pseudomonas testosteroni* y posee actividad de 3 β y 17 α hidroxisteroide deshidrogenasa. Este microorganismo posee también actividad de isomerasa que se encuentra localizada en una proteína distinta, tal como se describiera en la Introducción (Kawahara y col., 1962; Delin y col, 1964), a diferencia de los que ocurre en mamíferos, en los cuales ambas actividades se hallan asociadas a la misma proteína, aunque en distintos dominios (Thomas y col., 1988,1990; Luu-The y col., 1991, entre otros). La decisión de incubar el compuesto "N" con esta enzima comercial se basa en lo siguiente: Si se postula que el esteroide "N" posee un hidroxilo en C3 y si este hidroxilo se encuentra en la posición 3 β debería ser sustrato de la enzima. El protocolo de incubación utilizado inicialmente fué el aconsejado por Sigma Chem. Co. (ver Materiales y Métodos), en el cual se establece que el buffer de la incubación es pirofosfato 0.1 mM, pH 8.9. Por tratarse de un medio con un pH muy alcalino se decidió probar la estabilidad de diversos esteroides en ese pH. Para ello se incubaron distintos esteroides radiactivos en buffer pirofosfato 0.1 mM, pH 8.9 durante 60 min.. Como puede verse en la Tabla 14, ninguno de los esteroides sufrió modificaciones durante ese período de incubación.

Tabla 14

Estabilidad cromatográfica de distintos esteroides a pH 8.9

Esteroides	Producto	Sistema cromatográfico
"N"	"N"	Bush B5
Pregnenolona	Pregnenolona	TLC
Progesterona	Progesterona	TLC
Aldosterona	Aldosterona	Bush B5
Corticosterona	corticosterona	TP-G

Nota: Los distintos esteroides se incubaron durante 60 min en buffer pirofosfato 0.1 M, pH 8.9. TLC: benceno:acetona, 8:2; TP-G: tolueno-propilenglicol.

El análisis de las cromatografías de cada uno de los esteroides incubados evidenció la

presencia de un único pico correspondiente al esteroide analizado (datos no mostrados). Estos resultados permitieron encarar la incubación de los diversos sustratos con la enzima comercial y al pH aconsejado.

Los sustratos utilizados en las incubaciones con la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa fueron tanto el compuesto "N" como pregnenolona, otro esteroide con un hidroxilo en la posición C3, así como progesterona, corticosterona y aldosterona, como controles de especificidad de la deshidrogenación. Por otra parte también se decidió realizar las incubaciones a pH 7.2 ya que el mismo corresponde a la mayor parte de los experimentos llevados a cabo en esta tesis.

Como puede verse en la Tabla 15, ninguno de los 3-oxo-4-ene esteroides utilizados sufrió modificaciones luego de 60 min. de incubación con la enzima, independientemente del pH del medio. Sin embargo, cuando los esteroides utilizados como sustrato fueron pregnenolona, conocido 3 β -hidroxi-5-ene esteroide, y el compuesto "N", que se postula como un esteroide con un hidroxilo en la posición C3, los resultados son distintos. Como primer punto se puede señalar que ambos son sustrato de la enzima. Y luego, que la transformación que sufren cuando se los incuba con la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa es dependiente del pH del buffer.

A pH 8.9 ambos esteroides se transforman en compuestos menos polares que los sustratos de los cuales se originan. Así, pregnenolona origina un esteroide de menor polaridad que ella misma así como también menos polar que progesterona. Por otra parte el compuesto "N" se transforma igualmente en un esteroide menos polar que aquél y que aldosterona (Tabla 15). Estas formas menos polares podrían corresponder a los 3-oxo-5-ene derivados, que ya fueran descritos como intermediarios en la transformación de pregnenolona a progesterona (Thomas y col., 1990). El esteroide obtenido a partir de pregnenolona co-migra con el correspondiente estandar radioinerte (5-pregnen-3,20-ona) obtenido de Sigma Chem. Co.

Cuando se cambian las condiciones de incubación, utilizando pH 7.2 en lugar de 8.9, los resultados obtenidos son distintos: el compuesto "N" se transforma en aldosterona y pregnenolona en progesterona, tal como puede verse en la Tabla 15. Surge entonces la pregunta: Podría ocurrir que la fracción de deshidrogenasa estuviera contaminada con isomerasa? Y si es así, hay alguna justificación posible para el hecho de que a pH 8.9 la actividad de isomerasa, de existir, no se manifestara?

Como se dijera en párrafos anteriores, en *Pseudomonas testosteroni*, la actividad de

deshidrogenasa e isomerasa se encuentran asociadas a proteínas distintas. Los estudios de actividad en función del pH de ambas enzimas muestran que el óptimo de pH para la deshidrogenación se encuentra alrededor de 8.9-9.0, pHs a los cuales la actividad de isomerasa es muy baja. Por otra parte la isomerización es máxima a pHs 7.0-7.4, condición en la cual la enzima 3 β -deshidrogenasa conserva actividad significativa (Kawahara y *col.*, 1962; Delin y *col.*, 1964). Estas diferencias en los óptimos de pH para cada una de las actividades enzimáticas podrían justificar los resultados obtenidos en estos experimentos.

Tabla 15

Incubación de distintos esteroides con la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa obtenida de *Pseudomonas testosteroni*

Precursor	pH	Producto	Característica	Sistema cromatográfico
"N"	8.9	Y	Rs(s=aldo):1.68	Bush B5
"N"	7.2	Aldo	—	Bush B5
Preg	8.9	Z	Rs(s=prog):1.37	TLC
Preg	7.2	Prog	—	TLC
Prog	8.9	Prog	—	TLC
Prog	7.2	Prog	—	TLC
B	8.9	B	—	TP-G
B	7.2	B	—	TP-G
Aldo	8.9	Aldo	—	Bush B5
Aldo	7.2	Aldo	—	Bush B5

Nota: Se incubaron 0.5 μ Ci de cada uno de los esteroides tritados con 0.06 unidades de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de *P. testosteroni* durante 60 min a 28 °C. TLC= benceno:acetona (8:2); Y= esteroide menos polar que aldosterona; Z= esteroide menos polar que pregnenolona, co-migra con el standard radioinerte de 5-pregnen-3,20-diona. Preg: pregnenolona; Prog: progesterona; Aldo: aldosterona; B: corticosterona.

Que la isomerización no es espontánea a pH 7.2, queda demostrado por el hecho que ni el compuesto menos polar obtenido a partir de "N" ni el que se aísla a partir de pregnenolona

incubadas con la enzima a pH 8.9, se transforman en aldosterona y progesterona cuando se los incubaba por distintos tiempos a pH 7.2 en ausencia de enzima (datos no mostrados).

REQUERIMIENTO DE COFACTORES PARA LA CONVERSION DE "N" EN ALDOSTERONA

De los resultados obtenidos hasta el momento parecía desprenderse que el compuesto "N", que se comporta como un buen precursor para la biosíntesis de aldosterona, podría ser un esteroide con un hidroxilo en la posición C3 que se transforma en aldosterona a través de una deshidrogenación y la posterior isomenización del doble enlace $\Delta 5-6$ a $\Delta 4-5$. Como ya se ha mencionado esta transformación es catalizada por la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- $\Delta 4$ isomerasa, que requiere NAD^+ como cofactor. Con el objeto de conocer algo más acerca de la naturaleza del compuesto "N", se decidió estudiar el requerimiento de cofactores de la transformación de "N" en aldosterona. Para ello se utilizó como fuente de enzima homogenato de tejido interrenal proveniente de animales de primavera-verano y distintos cofactores (Tabla 16).

Tabla 16

Requerimiento de cofactores de la transformación de "N" en aldosterona.

Cofactor (0.5 mM)	Aldosterona (%)
—	7.45 ± 1.00
NAD^+	24.65 ± 1.32
NADH	8.34 ± 1.76
$NADP^+$	8.68 ± 0.97
NADPH	8.18 ± 1.20
$NADP^+$ + malato	7.96 ± 0.90

Nota: Se incubaron homogenatos provenientes de 50 mg de tejido interrenal con $0.4 \mu\text{Ci}$ de ^3H -"N" durante 30 min a 28°C . Los resultados están expresados como la media de los porcentajes del producto formado en 8 experimentos \pm el error standard. El ANOVA con contrastes a posteriori mostró diferencias altamente significativas para el cofactor NAD^+ ($p < 0.01$).

Como puede verse en la Tabla 16, la transformación estudiada parece depender de NAD⁺, mientras que ninguno de los otros cofactores ensayados estimula la biosíntesis de aldosterona significativamente respecto del control sin cofactor. El agregado de malato en una concentración de 5mM a los incubados que contenían NADP⁺ tampoco condujo a un aumento en la producción de aldosterona.

EFFECTO DEL AGREGADO DE CIANOCETONA (CNK) SOBRE LA TRANSFORMACION DE "N" EN ALDOSTERONA

La cianocetona (en adelante CNK)(2 α -ciano-4,4',17 α -trimetil-androst-5-ene-17 β -ol-3-ona) es un esteroide sintético de Laboratorios Winthrop (N 19578). La CNK es un conocido inhibidor competitivo de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ 4 isomerasa (3 β HSD/II) (Takahashi y col., 1990). Debido a esto, y dado que hasta el momento se postula que el compuesto "N" podría ser un 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona, se decidió estudiar el efecto de este inhibidor sobre la biosíntesis de aldosterona a partir de "N". Para ello se estableció inicialmente la concentración de CNK necesaria para obtener una inhibición máxima de la enzima antes mencionada. Con este objeto, se incubó pregnenolona-H³ con homogenato de interrenal de sapo con y sin el inhibidor utilizando NAD⁺ como cofactor (Tabla 17).

Tabla 17

Efecto de cianocetona sobre la transformación de Pregnenolona en Progesterona.

CNK	dpm progesterona	% de inhibición
0	68.526 \pm 3.220	—
10 ⁻⁶ M	37.282 \pm 1.940	54
10 ⁻⁵ M	10.278 \pm 1.063	85
10 ⁻⁴ M	9.235 \pm 1.345	87

Nota: Se incubaron 0.4 μ Ci de pregnenolona con el homogenato proveniente de 30 mg de tejido interrenal, 0.5 mM de NAD⁺ durante 60 min a 28°C. La formación de progesterona se determinó como fuera descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media de las dpm de progesterona formada en 4 experimentos por duplicado \pm error standard.

De la Tabla 17, puede concluirse que luego de una incubación de 60 min, se obtiene una máxima inhibición de la actividad enzimática con una concentración de 10^{-5} M del inhibidor. A partir de estos resultados se seleccionó esta condición para los experimentos en los cuales el compuesto "N" se utilizaba como sustrato.

La Tabla 18 muestra los porcentajes de transformación del compuesto "N" en aldosterona cuando se lo incuba con homogenato de tejido interrenal, 0.5mM de NAD^+ , con y sin el inhibidor mencionado. La presencia del inhibidor disminuyó significativamente la biosíntesis de aldosterona cuando se comparan los resultados con control sin CNK. Esta disminución se manifiesta con ambas concentraciones utilizadas, aún cuando es máxima (89%) con una concentración de 10^{-5} M de CNK. El vehículo utilizado, etanol en una concentración final de 1%, no afectó la transformación (datos no mostrados).

Tabla 18

Efecto de cianocetona sobre la transformación de "N" en aldosterona.

CNK	dpm progesterona	% de inhibición
0	68.526 ± 3.220	—
10^{-6} M	37.282 ± 1.940	54
10^{-5} M	10.278 ± 1.063	85
10^{-4} M	9.235 ± 1.345	87

Nota: Se incubaron 0.4 μCi de "N" con el homogenato proveniente de 30 mg de tejido interrenal, 0.5 mM de NAD^+ durante 60 min a 28°C . La formación de aldosterona se determinó como fuera descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media de las dpm de progesterona formada en 4 experimentos por duplicado \pm error standard.

Estos resultados indicarían nuevamente que la transformación de "N" a aldosterona estaría mediada por la enzima $3\beta\text{HSD}/\text{I}$, que como ya habíamos mencionado requiere NAD^+ como cofactor y se inhibe competitivamente por CNK.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento sugerirían que el compuesto "N" podría

tratarse del 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona, que se transformaría en aldosterona por acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa.

EFFECTO DEL AGREGADO DE CANTIDADES CRECIENTES DEL 3 β -HIDROXI-5-ENE ANALOGO DE ALDOSTERONA SOBRE LA TRANSFORMACION "N" EN ALDOSTERONA.

A partir de los resultados mencionados hasta aquí surgió la necesidad de establecer la influencia que podría tener la presencia del 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona (5-HAA) sobre la transformación de "N" a aldosterona. Para ello se utilizaron las mismas condiciones empleadas en los experimentos de requerimiento de cofactores con la excepción del agregado de cantidades crecientes de 5-HAA. La Tabla 19, muestra los resultados obtenidos en los experimentos de dilución isotópica.

Tabla 19

Efecto del agregado del analogo de aldosterona (5-HAA) sobre la biosíntesis de aldosterona a partir de "N"-H³.

5HAA	Aldo-H ³		"N"-H ³	
	nmoles	dpm	%	dpm
0	396.000 ± 17.300	100	1.025.490 ± 45.670	100
5	212.332 ± 13.200	54	1.235.520 ± 54.220	120
10	135.600 ± 22.350	34	1.288.225 ± 32.980	126
100	17.600 ± 5.350	4	1.403.890 ± 92.650	137
1000	N.D.	—	1.425.560 ± 121.000	139

Nota: Se incubaron 0.8 μ Ci de "N"-H³ con homogenato proveniente de 50 mg de tejido y cantidades crecientes de 5-HAA. Se utilizó NAD⁺ 0.5 mM como cofactor. La incubación se llevó a cabo a 28°C y por 30 min. Para mas detalles ver Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media de las dpm formadas en 4 experimentos por duplicado \pm error standard.

Como puede observarse, el agregado de 5-HAA provoca una disminución en la transformación de "N" a aldosterona. El agregado de 100 nmoles de 5-HAA reduce la transformación a solo un 4% de los valores control sin el agregado de 5-HAA. Estos resultados

indican que el analogo de aldosterona compite por la misma enzima con el compuesto "N".

Como corolario de esta primera parte se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la biosíntesis de aldosterona, utilizando distintos sustratos. La Tabla 20 muestra esos resultados. Como puede observarse, si bien corticosterona es sustrato para la biosíntesis de aldosterona, los mayores rendimientos se obtienen a partir del compuesto "N" en presencia de NAD⁺. Tal como se había expuesto en párrafos anteriores la 18-OH-B no es sustrato para la biosíntesis de aldosterona, en ninguna de las condiciones de cofactores utilizadas. Esto es así para la forma "M" y para la forma "L", independientemente de su origen, comercial o biológico.

Tabla 20

Incubación de corticosterona, 18-OH-B y "N" con homogenato de interrenales de sapo.

Sustrato	Cofactor	Pmoles aldo/min/mg
corticosterona	NADP ⁺ + malato	0.15 ± 0.03
	NADPH	0.13 ± 0.03
18-OH-B (a)	NADP ⁺ + malato	N.D.
	NADPH	N.D.
L4.33	NADP ⁺ + malato	N.D.
	NADPH	N.D.
18-OH-B (b)	NADP ⁺ + malato	N.D.
	NADPH	N.D.
L3	NADP ⁺ + malato	N.D.
	NADPH	N.D.
Compuesto "N"	Ninguno	0.94 ± 0.11
	NADP ⁺ + malato	0.97 ± 0.14
	NADP ⁺	0.99 ± 0.10
	NADPH	0.91 ± 0.13
	NADH	0.99 ± 0.19
	NAD ⁺	2.74 ± 0.24

Nota: Las incubaciones se realizaron durante 30 minutos utilizando homogenato de interrenal como fuente de enzima. Se utilizaron las proteínas provenientes de 30 mg de tejido para el compuesto "N" y de 50 mg de tejido para corticosterona y 18-OH-B. La concentración de cofactores fue de 0.5 mM y la de malato de 5 mM. La concentración de sustrato fue de 10 μM (Ae= 72 mCi/mmol). Las condiciones fueron establecidas en experimentos previos y corresponden a la zona lineal de las curvas de tiempo y tejido para corticosterona y "N". Los valores se expresan como la media de 4 experimentos ± error standard. N.D.= no detectable; (a)= 18-OH-B comercial; (b)= 18-OH-B de sapo. L3 y L4.33= formas menos polares de 18-OH-B de sapo y comercial.

La Tabla 21, muestra las relaciones H³/C¹⁴ durante la purificación de aldosterona utilizando distintos sustratos, Como se desprende de dicha tabla, el producto formado a partir del compuesto "N" es de alta pureza, alcanzándose la constancia en la relación entre los dos isótopos desde el primer paso de purificación. Esto sería de esperar si el compuesto "N", tal como se sostenía hasta ese momento, se tratara del 3β-hidroxi-5-ene analogo de aldosterona que se transforma en aldosterona por acción de la enzima 3β-HSD.

Tabla 21

Relaciones H³/C¹⁴ durante la purificación de aldosterona.

Sustrato	Cofactor	Inicial	Aldo-like	Aldo-Ac	Lac1	Lac2
Corticosterona	NADP ⁺ + malato	72.31	7.45	2.10	1.60	1.62
	NADPH	70.35	6.38	1.97	1.36	1.37
18-OH-B	NADP ⁺ + malato	69.65	2.16	0.98	0.56	0.45
	NADPH	48.00	2.03	1.06	0.34	0.54
Compuesto "N"	NAD ⁺	38.05	8.61	8.39	8.32	8.64
	NAD ⁺	25.34	6.72	6.87	6.90	6.68

Nota: Los resultados representan 6 experimentos típicos en los cuales se utilizaron diversos precursores y cofactores. La 18-OH-B utilizada corresponde a la hormona comercial. Ac.= acetato; 1Lac= primera lactona de aldosterona; 2Lac= segunda lactona. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

CROMATOGRAFIA GASEOSA Y ESPECTROMETRIA DE MASA DEL COMPUESTO "N".

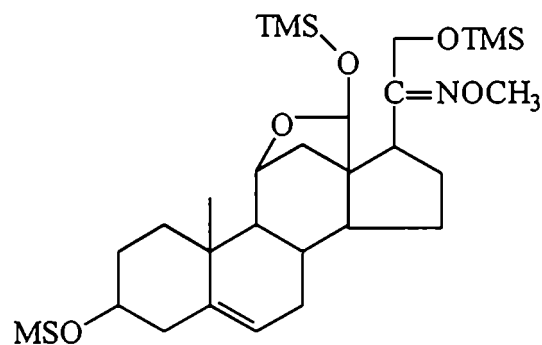
El compuesto "N", aislado de incubaciones con tejido interrenal de sapo utilizando pregnenolona radioactiva y radioinerte como precursor, fue analizado por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (CGL-M) como los derivados trimetil silil eter (TMS) y trimetil silil eter-metil oxima (TMS-MO)

Todos los CGL-M fueron realizados en el Laboratorio del Dr. Cedric Shackleton, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, USA. Posteriormente, se analizaron los mismos derivados del esteroide de referencia $3\beta,11\beta,21$ -trihidroxi-20-oxo-5-pregnen-18-al (5-HAA).

El análisis del derivado trimetil silil eter-metil oxima (TMS-MO) del compuesto "N", mostró la presencia de tres componentes, dos de los cuales poseían espectros de masa idénticos y podrían representar las formas *syn* y *anti* de las C-20 metil oximas (Fig. 4, espectro A). En el espectro de masa A (Fig. 4) el mayor ión obtenido fué el m/c 592 que puede ser interpretado como M-15 (metilo) del ión molecular (M^+) de m/c 607, que no se detecta. El pico mas importante corresponde a m/c 504 (M-103). La pérdida de 103 unidades de masa es indicativa de la presencia de un grupo con un hidroxilo primario (C-21).

El espectro obtenido es similar al de tetrahydroaldosterona, cuyo ión mas importante posee dos unidades mas, lo cual sugiere una estructura parecida con el agregado de un doble enlace en el compuesto "N" (Honour y Shackleton, 1977).

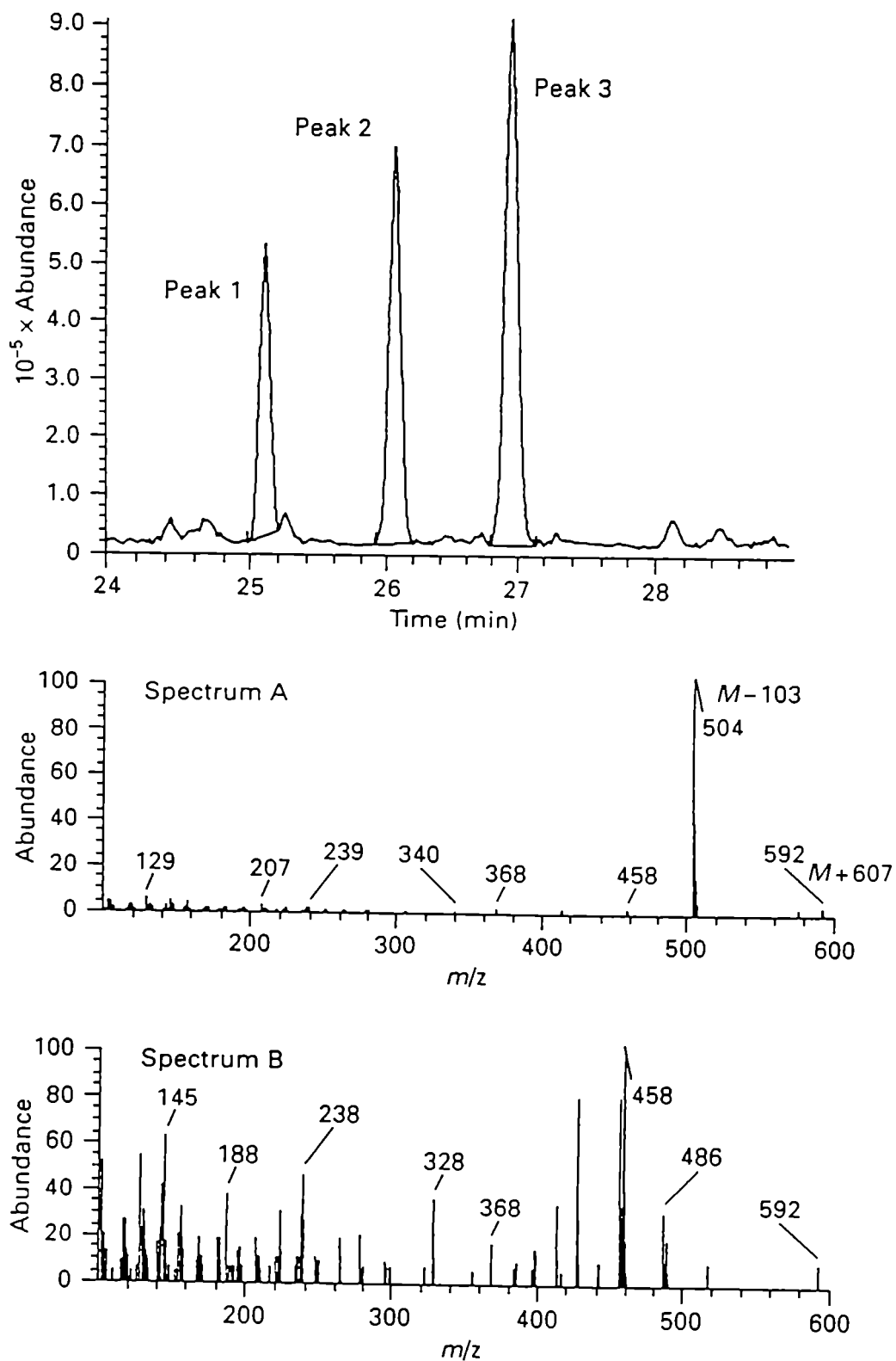
El ión m/c 607 indica la presencia de tres grupos TMS [en las posiciones 3,18(hemiacetal) y 21] y una metil oxima (C-20).



Derivado TMS-MO

Figura 4

Espectros de masa de los derivados TMS-MO del Compuesto "N"



El espectro de masa del primer componente del compuesto "N" (Fig. 4, espectro B), minoritario, posee un ión de m/c 592, sugiriendo la existencia de un ión M^+ de 607. Esto sugiere claramente la presencia de tres grupos TMS y una oxima. Sin embargo su espectro difiere bastante de aquellos de los componentes mayoritarios, y no ha sido posible interpretarlo. Los grupos TMS podrían estar en las posiciones C-3, C-11 y C-21.

La Figura 5 muestra dos picos con distintos tiempos de retención obtenidos con el derivado trimetil silil eter (TMS). Los espectros de masa de los dos picos se muestran en la Figura 5 (espectros A y B). El segundo, y mas importante de los componentes, posee el espectro B de la Figura 5. En dicho espectro de masa se observa el ión molecular (M^+) 578 y una de las fragmentaciones mas abundantes, resultante de la pérdida de un grupo hidroxilo primario en C-21 (M-103), es la que corresponde al ión m/c 475. Las pérdidas mas importantes incluyen los grupos trimetil silanol (m/c 90)(m/c 385, M-103-90; m/c 295, M-103-90-90). El ión m/c 239 corresponde a la estructura básica de los anillos después de haber perdido el C-20 con el oxígeno y el C-18 con el oxígeno (m/c 295-46). Este espectro es también similar al publicado para el derivado TMS de tetrahidroaldosterona (Honour y Shackleton, 1977). La única diferencia entre ambos radica en que los fragmentos se derivado TMS de tetrahidroaldosterona posee dos unidades mas de masa. El primer pico cromatográfico dio lugar al espectro A de la Figura 5. En el mismo puede observarse la ausencia del ión molecular (M^+) 578 y esencialmente posee los mismos iones que el espectro B de la Figura 5, aunque con una abundancia relativa distinta.

Los derivados obtenidos se muestran a continuación:

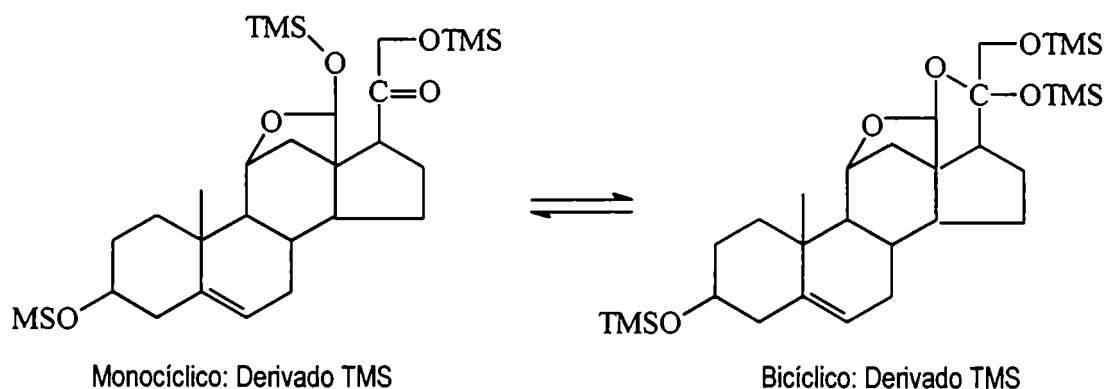
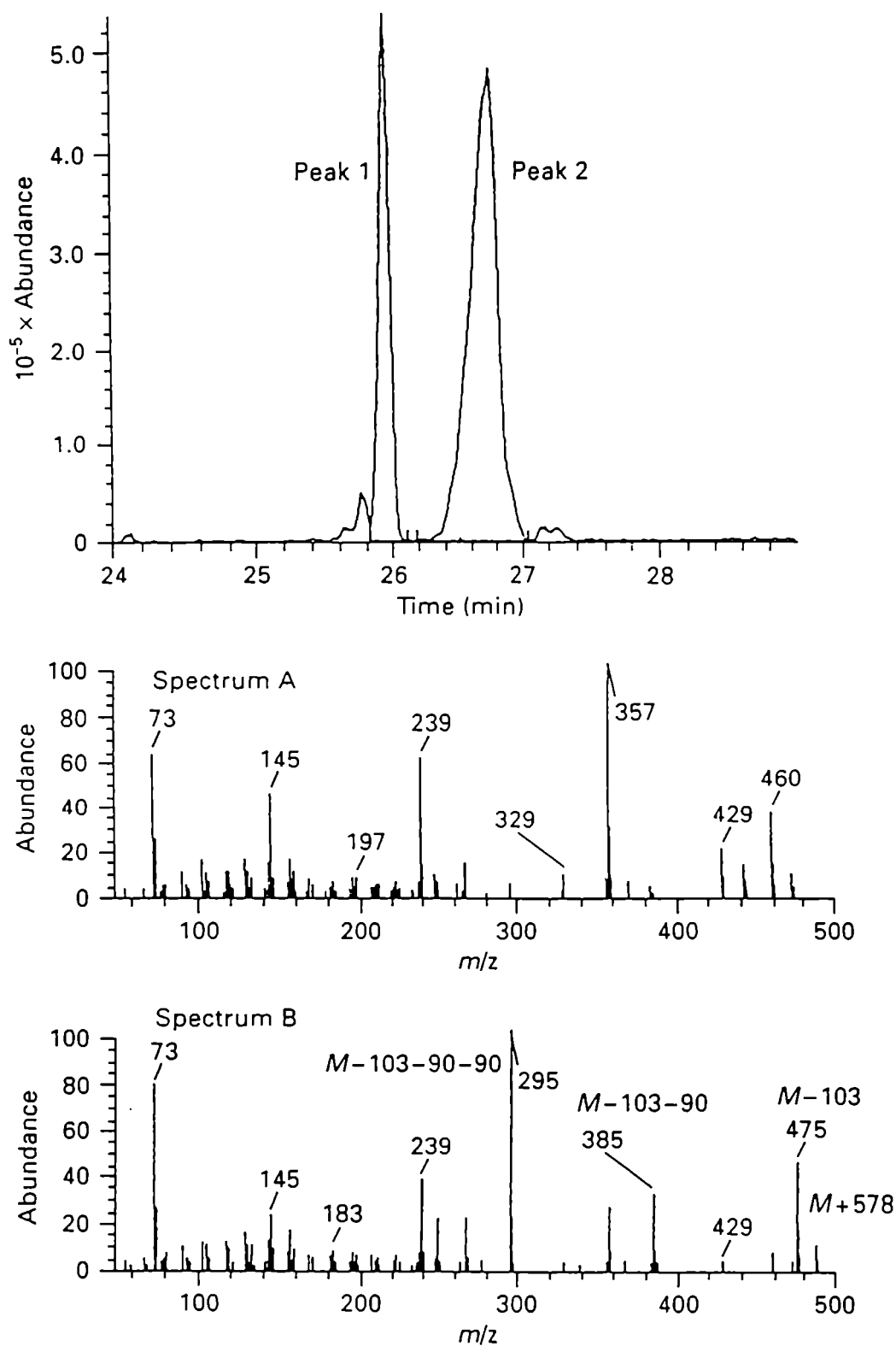


Figura 5

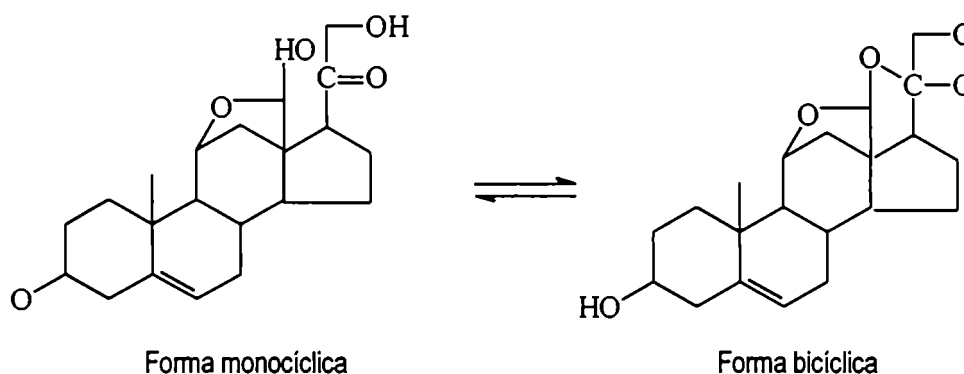
Espectros de masa de los derivados TMS del Compuesto "N"



En base a estos resultados se llevó a cabo la identificación provisoria del compuesto "N" como el 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona.

Con el objeto de confirmar esta hipótesis se analizaron los derivados TMS-MO y TMS del esteroide de referencia 3 β ,11 β ,21-trihidroxi-5-pregnen-20-ona-18-al por CGL-M. El mismo fué sintetizado por el Dr. Marcel Hamik de la Universidad de Tel Aviv, Israel (Hamik y *col.*, 1985). Tanto los derivados TMS-MO como TMS del esteroide mencionado dan los mismos tiempos de retención que los picos mayoritarios del compuesto "N" (formas *syn* y *anti* de los TMS-MO, 26.09 y 26.98 y pico desconocido presente en el compuesto "N" y el standard, 25.12; derivado TMS, 25.94 y 26.76) (Fig. 6 y 7). Los espectros de masa del standard son idénticos a los del compuesto "N" (Fig. 6 espectros A y B y 7).

Por qué se observan dos picos en la CG del derivado TMS? Los estudios realizados con 5-HAA muestran que, en el estado sólido, el standard se encuentra principalmente en la forma bicíclica (Hamik y *col.*, 1985). Por otra parte, los estudios de RMN, en CCl₃D muestran la presencia de las formas mono y bicíclicas en cantidades prácticamente equivalentes (Hamik y *col.*, 1985), las que se muestran a continuación.



Estas características hacen que no sea inesperado encontrar que los derivados TMS del esteroide sintético y el compuesto "N" (que parece ser idéntico a aquél) den lugar a dos picos cuando se los analiza por CGL-M. La pregunta que se plantea como consecuencia es: cuál de los picos de la Figura 4 corresponde a la forma monocíclica y cual a la bicíclica? Como puede verse en la Figura mencionada, el segundo pico es mas ancho que el primero, lo cual podría ser interpretado como debido a la presencia de un grupo polar desprotegido en la molécula.

Esto ocurre solo en la forma monocíclica que posee un grupo carbonilo en el C-20.

Es de hacer notar que, si bien el ión m/c 129 está presente en los picos mayoritarios, no es el ión predominante como suele ocurrir en los derivados TMS-MO de este tipo de esteroides. Este hecho no ha podido ser explicado satisfactoriamente.

La Tabla 22 muestra un resumen de los tiempos de retención absolutos y los índices de Kovacs de ambos derivados. Claramente puede observarse que los materiales sintéticos y de origen biológico tienen los mismos tiempos de retención y los mismos índices de Kovacs, aunque diferente proporción de las formas mono y bicíclicas (Figura 5a y 7a). Esto último no es de extrañar dado que el compuesto "N" es un producto natural que puede poseer más carbonos asimétricos que el estándar. Por la misma razón "N", en contraste con el estándar, obtenido por síntesis orgánica, puede estar formado por una mezcla tautomérica que aún no alcanzó el equilibrio.

Tabla 22

Tiempos de retención e índices de Kovacs de los derivados TMS y TMS-MO del compuesto "N" y del Standard 3 β ,11,21 trihidroxi-5-pregnen-20-ona-18-al.

Derivado	Parámetro	Pico 1	Pico 2	Pico3
TMS	Tr Compuesto "N"	25.99	26.79	–
	Tr Estándar	25.94	26.76	--
	IK Compuesto "N"	31.20	31.60	--
	IK Standard	31.18	31.58	--
TMS-MO	Tr Compuesto "N"	25.14	26.10	26.97
	Tr Estándar	25.12	26.09	26.98
	IK Compuesto "N"	30.90	31.25	31.65
	IK Standard	30.88	31.30	31.65

Nota: Tr: tiempo de retención; Ik: índices de Kovacs de los derivados TMS y TMS-MO del compuesto "N" y del standard .

Todos los resultados obtenidos hasta aquí, nos permitieron identificar al compuesto "N" como

el 3 β -hidroxi análogo de aldosterona. Estos resultados, sumados a la importante capacidad precursora de aldosterona que posee "N", a la menor precursoriedad de corticosterona y a la falta de capacidad de 18-OH-B, indicarían que en *Bufo arenarum*, la isomerización del doble enlace $\Delta 5$ a $\Delta 4$ es un paso muy tardío en el camino biosintético de aldosterona.

Figura 6

Espectros de masa de los derivados TMS del estandar

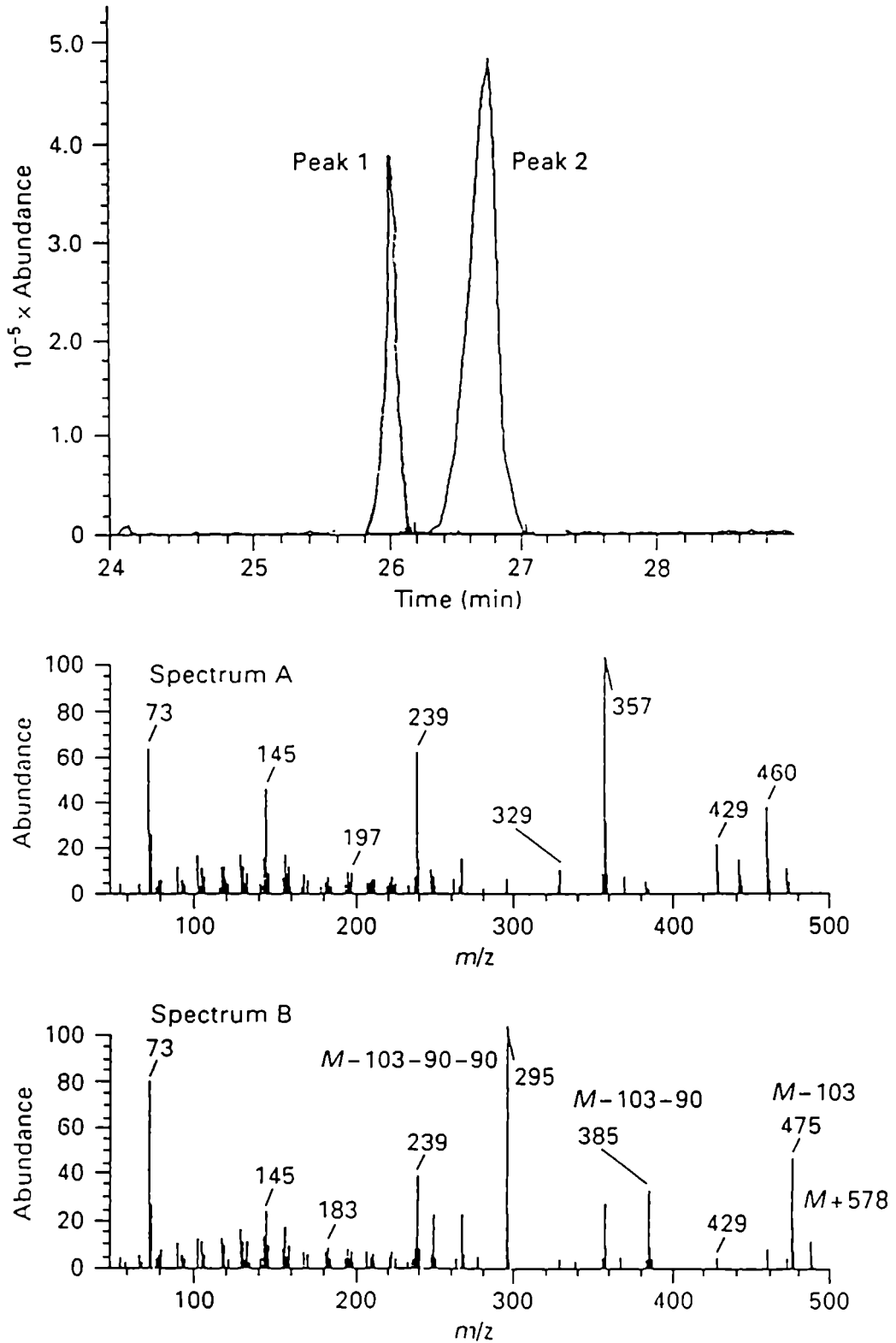
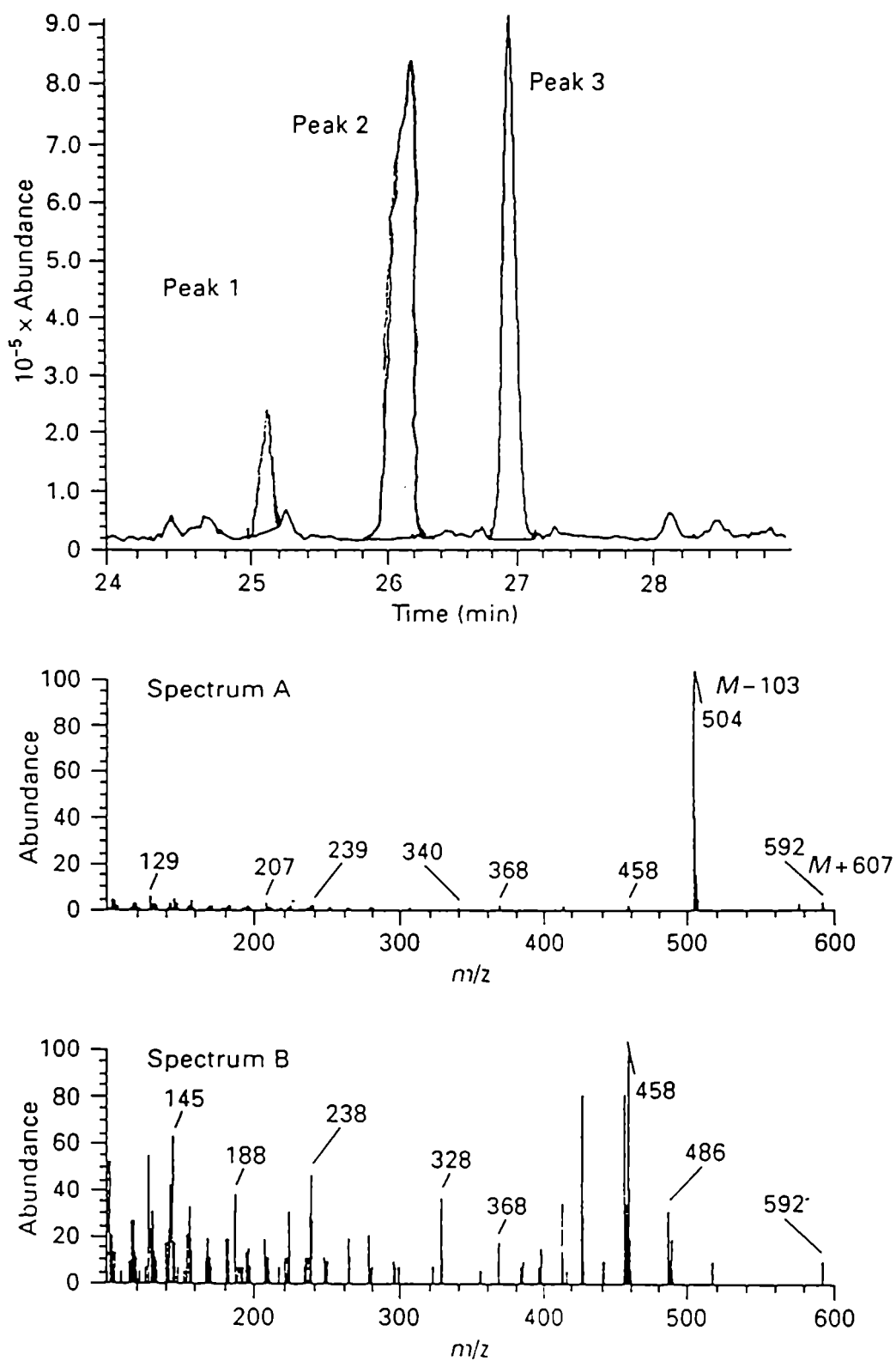


Figura 7

Espectros de masa de los derivados TMS-MO del estandar



ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA- Δ 4 ISOMERASA EN INTERRENALES DE SAPO

Hasta este momento del trabajo se habían confirmado las evidencias previas que indicaban la existencia de un camino Δ 5 para la biosíntesis de aldosterona en la interrenal del sapo *Bufo arenarum*. Esto se había logrado fundamentalmente por la caracterización del material aislado a partir de incubaciones de interrenales con pregnenolona a 28°C como el 3 β -hidroxi análogo de aldosterona (3 β ,11 β ,21-trihidroxi-20-oxo-5-pregnen-18-al).

Por otra parte también se había establecido que el 3 β -hidroxi análogo de aldosterona era mejor precursor para la biosíntesis de aldosterona (por lo menos en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis) que corticosterona y 18-hidroxycorticosterona (ambos intermediarios conocidos del camino Δ 4 en numerosas especies) (ver Tabla 20 como resumen).

Como consecuencia de lo mencionado en los párrafos anteriores surgió la idea de estudiar la enzima 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ 4 isomerasa (en adelante 3 β HSD/I). Como se mencionara en la Introducción esta enzima cataliza un paso obligatorio para la biosíntesis de esteroides tanto en la vía Δ 4 como Δ 5. En general, en aves y mamíferos, la 3 β HSD/I se localiza en el retículo endoplásmico (fracción microsomal) de glándulas esteroideogénicas como adrenal, ovario y testículo. Como excepción a lo dicho anteriormente, en placenta humana y en adrenal bovina se pudo medir la actividad de esta enzima también en las mitocondrias.

En el sapo, la 3 β HSD/I (por establecer en que punto de la vía de síntesis comienza el camino Δ 4) podría ser regulada para la "elección" entre un camino biosintético u otro (Δ 4 vs Δ 5) en función de los requerimientos de corticosterona ó de aldosterona. Esto podría llevarse a cabo utilizando pregnenolona o el análogo de aldosterona como sustrato. No existen trabajos en la literatura acerca de la actividad de esta enzima en interrenales de anfibios ni acerca de su posible papel regulatorio.

Los primeros estudios que se realizaron tuvieron que ver con la localización subcelular de la enzima 3 β HSD/I.

Dado que los estudios se realizaron con interrenales de animales provenientes de distintas épocas del año, se decidió analizar si existían cambios en el peso de las interrenales y en el contenido de proteínas de cada fracción en función de la época del año de la cual provenían los ejemplares. La Tabla 23 muestra un resumen de esas determinaciones.

Tabla 23

Peso y mg de proteínas de las interrenales provenientes de animales provenientes de distintas épocas del año.

Epoca	Peso por glándula (mg)	Proteínas Totales por glándula (mg)	µg de Proteínas Mitocondriales	µg de Proteínas Microsomales
Primavera-verano	14.2 ± 1.3*	1.63 ± 0.32	109 ± 6.8	201 ± 16.5
Otoño-invierno	9.8 ± 0.5	1.57 ± 0.29	106 ± 5.9	183 ± 12.9

Nota: Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry. Los resultados están expresados como la media de 30 interrenales para cada época del año ± el error estándar. El (*) indica diferencias significativas entre las temporadas con un $p < 0.01$.

Como se observa en la Tabla 23, existen diferencias significativas en el peso de las interrenales entre las dos épocas del año. Sin embargo, el contenido de proteínas totales así como el de las fracciones mitocondrial y microsomal no difiere significativamente. A partir de esto podría especularse que el aumento en el peso de la adrenal podría deberse a un incremento en el contenido de lípidos y/o agua del tejido. Dado que las proteínas totales y de las fracciones ensayadas no se modifican entre los ejemplares capturados en distintos momentos del año es que decidimos expresar todos los resultados obtenidos a partir de aquí por mg de proteínas. Esta forma de expresión de los resultados es representativa de lo que ocurre en la interrenal como un todo.

Actividad de 3βHSD/I en interrenales provenientes de animales recolectados en primavera-verano.

La cantidad de enzima utilizada así como el tiempo de incubación se determinaron previamente de manera tal de garantizar que las mediciones de actividad se llevaran a cabo en condiciones de saturación.

En la Tabla 24 se muestra la distribución subcelular de la actividad de 3βHSD/I en interrenal de sapo. Como puede observarse la actividad de esta enzima co-localiza tanto con la actividad de succinato deshidrogenasa (marcador mitocondrial) como de glucosa 6-fosfatasa (marcador de retículo endoplásmico). Estos resultados indican que la enzima puede encontrarse tanto en

mitocondrias como en microsomas. La actividad mitocondrial se manifiesta aún en las mitocondrias purificadas en las que no fue posible detectar actividad de glucosa 6-fosfatasa. Los resultados utilizando sacarosa o Percoll para la purificación fueron similares. Como consecuencia de los resultados obtenidos podría concluirse que la actividad medida en las mitocondrias no es producto de contaminación con membranas microsomales sino que corresponde a la actividad intrínseca de la fracción

Tabla 24

Localización subcelular de la actividad de 3 β HSD/I en interrenal de sapos de primavera-verano.

	Actividad específica (nmoles/min.mg proteínas)		
	3 β HSD/I	SDH	Glu-6-pasa
Homogenato	0.109 \pm 0.15	2.80 \pm 0.98	2.56 \pm 1.06
Núcleos	0.276 \pm 0.11	0.87 \pm 0.13	N.D.
Mitocondrias(i)	0.608 \pm 0.07	13.34 \pm 1.75	3.70 \pm 0.70
Mitocondrias(p)	0.718 \pm 0.09	18.47 \pm 2.04	N.D.
Microsomas	0.858 \pm 0.10	1.20 \pm 0.75	72.00 \pm 3.5
Soluble	0.071 \pm 0.05	N.D.	6.10 \pm 1.85

Nota: La actividad de 3 β HSD/I se determinó incubando 20 minutos con pregnenolona[H³] como sustrato en una concentración de 25 μ M. Se utilizaron 50 μ g de proteínas y 0.5 mM de NAD⁺. Las determinaciones se realizaron a 28°C. Para mas detalles ver Materiales y Métodos. SDH: succinato deshidrogenasa en nmoles de formazan/min.mg de proteínas; 3 β HSD/I: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ 4 isomerasa en nmoles/min.mg proteínas; Glu-6-Pasa: glucosa 6 fosfatasa en nmoles de Pi/min.mg proteínas. Pi: fosfatos. Mitocondrias (i): mitocondrias impuras. Mitocondrias (p): mitocondrias purificadas. Los resultados están expresados como la media de 6 experimentos \pm error estándar.

Para corroborar los resultados anteriores y determinar su localización intramitocondrial, se aislaron mitoplastos por la técnica de digitonina y se midió actividad enzimática en varias fracciones submitocondriales. La separación exitosa de la membrana externa mitocondrial se corroboró midiendo la actividad de tres enzimas marcadoras, a saber: monoaminoxidasa

(membrana externa mitocondrial), adenilato kinasa (espacio intermembrana) y succínico deshidrogenasa (membrana interna mitocondrial). La Tabla 25 muestra los resultados obtenidos.

Como puede verse en la Tabla 25, la actividad de la 3 β HSD/I se asocia con la actividad de SDH, es decir se localiza en la membrana interna mitocondrial.

Tabla 25

Localización submitocondrial de la actividad de 3 β HSD/I en interrenales de sapos de primavera-verano.

	Actividad específica (nmoles/min.mg proteínas)			
	3 β HSD/I	SDH	AQ	MAO
Mitocondrias(p)	0.718 \pm 0.09	18.47 \pm 2.04	3.32 \pm 0.45	101.53 \pm 5.72
Mitoplastos	1.56 \pm 0.32	37.62 \pm 6.25	N.D.	7.23 \pm 1.12
Membrana externa	N.D.	N.D.	N.D.	196 \pm 6.33
Intermembrana	N.D.	N.D.	8.96 \pm 0.95	N.D.

Nota: MAO: monoaminoxidasa; AQ: adenilato quinasa. El resto de las abreviaturas y condiciones experimentales corresponden a la Tabla 24. Los resultados están expresados como la media de 5 experimentos \pm error estándar.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos en sapo se decidió estudiar, en las condiciones experimentales utilizadas en la presente Tesis, la distribución de la actividad de la 3 β HSD/I en adrenales de rata y de pollo. Recordemos que en estas especies numerosos autores han descrito sólo actividad microsomal.

Las Tablas 26 y 27 muestran que, tal como fuera descrito, la actividad de la enzima en estudio queda reducida a la fracción microsomal dado que co-expresa con la enzima glucosa-6-fosfatasa. Si bien una pequeña actividad puede medirse en las mitocondrias impuras, tanto en adrenales de pollo como de rata, la misma desaparece cuando la fracción se purifica utilizando un colchón de sacarosa. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos para estas glándulas esteroideogénicas.

Tabla 26

Localización subcelular de la actividad de 3 β HSD/I en adrenales de rata.

	Actividad específica (nmoles/min.mg proteínas)		
	3 β HSD/I	SDH	Glu-6-pasa
Homogenato	0.077 \pm 0.01	5.10 \pm 0.78	4.35 \pm 0.68
Núcleos	0.044 \pm 0.01	1.07 \pm 0.33	2.08 \pm 0.16
Mitocondrias(i)	0.096 \pm 0.07	14.00 \pm 1.10	3.70 \pm 0.70
Mitocondrias(p)	N.D.	17.00 \pm 1.04	0.97 \pm 0.10
Microsomas	0.620 \pm 0.15	2.00 \pm 0.45	35.40 \pm 2.49
Soluble	0.014 \pm 0.01	N.D.	N.D.

Nota: La actividad de 3 β HSD/I se determinó utilizando 25 μ M del sustrato pregnenolona y 25 μ g de proteínas. Las determinaciones se realizaron a 37°C. Para las abreviaturas ver Tabla 24. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos \pm error estándar.

Tabla 27

Localización subcelular de la actividad de 3 β HSD/I en adrenales de pollo.

	Actividad específica (nmoles/min.mg proteínas)		
	3 β HSD/I	SDH	Glu-6-pasa
Homogenato	0.330 \pm 0.15	0.87 \pm 0.08	2.39 \pm 1.06
Núcleos	0.101 \pm 0.08	0.74 \pm 0.13	2.15 \pm 0.98
Mitocondrias(i)	0.520 \pm 0.12	1.79 \pm 0.75	6.79 \pm 0.99
Mitocondrias(p)	0.052 \pm 0.03	9.20 \pm 2.04	1.52 \pm 0.38
Microsomas	1.361 \pm 0.31	0.89 \pm 0.75	13.18 \pm 3.5
Soluble	0.021 \pm 0.01	0.17 \pm 0.07	N.D.

Nota: La actividad de 3 β HSD/I se determinó utilizando 25 μ M del sustrato pregnenolona y 50 μ g de proteínas. Las determinaciones se realizaron a 37°C. Para las abreviaturas ver Tabla 24.

Tomados en conjunto estos resultados permiten concluir que en *Bufo arenarum*, la enzima en estudio se asocia a dos localizaciones subcelulares que podrían tener significado regulatorio, a saber, mitocondrias y retículo endoplásmico.

Ahora bien, esta distribución subcelular establecida para interrenales de animales de primavera-verano, período en el cual se produce una activa biosíntesis de gluco y mineralocorticoides se mantiene en animales de otoño-invierno? Se produce alguna modificación en la actividad de la enzima en el período de menor actividad de la especie en estudio?. Recordemos (ver Introducción), que corticosterona es un esteroide que se produce en mayor cantidad en este período del año (Ceballos y col., 1983).

Para responder estas preguntas se repitieron los experimentos utilizando como fuente de 3 β HSD/I interrenales provenientes de ejemplares recolectados en la temporada mencionada mas arriba. En la Tabla 28 puede verse la distribución subcelular de la actividad de 3 β HSD/I así como la de los marcadores correspondientes en animales recolectados durante el período de menor temperatura.

Tabla 28

Localización subcelular de la actividad de 3 β HSD/I en interrenales de animales de otoño-invierno.

	Actividad específica (nmoles/min.mg proteínas)		
	3 β HSD/I	SDH	Glu-6-pasa
Homogenato	0.069 \pm 0.01	19.86 \pm 2.70	10.61 \pm 1.06
Núcleos	0.045 \pm 0.02	9.74 \pm 1.98	3.15 \pm 1.08
Mitocondrias(i)	0.280 \pm 0.04	67.42 \pm 9.40	13.27 \pm 1.40
Mitocondrias(p)	0.360 \pm 0.03	102,05 \pm 12.30	N.D.
Microsomas	1.190 \pm 0.40	6.26 \pm 0.93	29.26 \pm 1.92
Soluble	0.016 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	N.D.

Nota: La actividad de 3 β HSD/I se determinó utilizando 25 μ M del sustrato pregnenolona y 40 μ g de proteínas. Las determinaciones se realizaron a 28°C. Para las abreviaturas ver Tabla 24. Los resultados están expresados como la media de 5 experimentos \pm error estándar.

A semejanza de lo observado con animales de primavera-verano (ver Tabla 24) la enzima se localiza en ambas fracciones subcelulares. Sin embargo, es destacable que la actividad de la 3 β HSD/I microsomal es mayor que en las interrenales provenientes de animales sometidos a temperaturas mas elevadas, lo cual parece ser coincidente con la aparente mayor actividad de la vía Δ 4 involucrada en la biosíntesis de corticosterona en los animales de invierno (Ceballos y col., 1992). Por otra parte, la enzima mitocondrial posee menor actividad que la enzima microsomal.

Dado que la actividad mitocondrial parece disminuir se especuló con que esa localización podría estar involucrada con la biosíntesis de aldosterona y la microsomal con la de corticosterona. Como consecuencia se decidió estudiar las constantes cinéticas de la enzima de ambas localizaciones para pregnenolona y el 3 β -hidroxi analogo de aldosterona (5-HAA).

En la Tabla 29 se expresan los parámetros cinéticos de la enzima microsomal y mitocondrial de interrenal de sapo de distintas épocas del año, utilizando pregnenolona como sustrato.

Tabla 29

Constantes cinéticas para la pregnenolona de la enzima 3 β HSD/I mitocondrial y microsomal de interrenal de sapo provenientes de animales de primavera-verano y otoño-invierno.

Localización	Epoca	Km ap	Vmax
Microsomal	Primavera-verano	0.82 \pm 0.10	0.75 \pm 0.16*
	Otoño-invierno	0.65 \pm 0.22	1.47 \pm 0.56
Mitocondrial	Primavera-verano	25.0 \pm 3.3	0.68 \pm 0.21*
	Otoño invierno	21.7 \pm 2.9	0.32 \pm 0.12

Nota: Los ensayos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones constantes de cofactor (NAD⁺ 0.5 mM) y variables de sustrato (0.01 y 200 μ M). Km aparente (μ M) y Vmax (nmoles/min/mg proteínas) se calcularon utilizando la linealización de Wilkinson. Los resultados están expresados como la media de 7 experimentos \pm error estándar. (*) Diferencias significativas en la Vmax entre las distintas épocas del año, p < 0.01.

Si bien ambas localizaciones poseen una V_{max} semejante cuando se trabaja con tejido proveniente de animales de primavera-verano, el K_m ap. de la enzima mitocondrial es mucho mayor, lo cual indicaría una menor afinidad por pregnenolona. Estas diferencias de afinidad entre ambas localizaciones se mantienen en animales de otoño-invierno. Sin embargo, La situación es diferente cuando analizamos la V_{max} , que es un indicador de la cantidad de enzima presente en la preparación. En los animales de otoño-invierno se observa una disminución significativa de la V_{max} de la enzima mitocondrial y un aumento, también significativo, de dicho parámetro cinético en la localización microsomal.

Se podría suponer que, en épocas de baja temperatura ambiente y por consiguiente de disminución en la cinética de los procesos (no hay que olvidar que se habla de animales poiquilotermos), el sistema compensa aumentando la cantidad de enzima disponible para catalizar la biosíntesis de progesterona. Progesterona es un intermediario del camino $\Delta 4$ que conduce a la biosíntesis de corticosterona, que es el glucocorticoide de esta especie.

Para corroborar el supuesto que la enzima de localización mitocondrial cataliza la transformación del 5-HAA en aldosterona, se analizaron los mismos parámetros cinéticos utilizando este intermediario como sustrato. La Tabla 30 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 30

Constantes cinéticas para la 5-HAA de la enzima 3β HSD/l mitocondrial y microsomal de interrenal de sapo provenientes de animales de primavera-verano y otoño-invierno.

Localización	Epoca	K_m ap	V_{max}
Microsomal	Primavera-verano	14.0 ± 1.20	$0.39 \pm 0.13^*$
	Otoño-invierno	16.5 ± 0.9	1.27 ± 0.36
Mitocondrial	Primavera-verano	0.74 ± 0.13	$0.59 \pm 0.16^*$
	Otoño invierno	0.67 ± 0.19	0.31 ± 0.14

Nota: Los ensayos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo como en la Tabla 29. K_m aparente (μM) y V_{max} (nmoles/min/mg proteínas). Los resultados están expresados como la media de 8 experimentos \pm error estándar. (*) Diferencias significativas en la V_{max} entre las distintas épocas del año, $p < 0.01$

Si bien los valores de V_{max} , así como sus variaciones en las distintas épocas del año son semejantes a las determinadas utilizando pregnenolona como sustrato, se observa notorias diferencias en el K_m ap. Cuando se utiliza 5-HAA como sustrato los valores de afinidad se modifican, la localización mitocondrial posee un K_m mucho menor que la microsomal. Estos resultados permiten concluir que esa localización podría estar involucrada en la biosíntesis de aldosterona a partir de 5-HAA y como consecuencia determinaría la vía $\Delta 5$ para la síntesis del mineralocorticoide.

Si bien esta tesis no está abocada al estudio de enzimas metabólicas, no escapa a la observación el aumento en la actividad de enzimas del metabolismo (Tablas 25 y 28), como succínico deshidrogenasa (SDH, enzima del ciclo de Krebs) y glucosa-6-fosfatasa (glu-6-pasa, enzima que participa en la defosforilación de glucosa-6-fosfato), que se observa en animales de invierno. Como se dijo en la Introducción, (ver Hazel y Proser, 1974), algunas enzimas claves del metabolismo compensan la disminución de temperatura ambiente por diversos mecanismos, uno de los cuales parece ser el aumento en la cantidad de enzima. Podría especularse, entonces, que ambas enzimas poseen mayor actividad en las preparaciones provenientes de animales de invierno por las razones que se expondrán a continuación para SDH: Como ya se dijo esta enzima es parte del ciclo de Krebs y si bien el metabolismo es menor en los animales de invierno, un descenso muy marcado en la actividad de las enzimas metabólicas, como consecuencia de la menor temperatura del animal podría conducir a la muerte. Entonces lo que podría estar ocurriendo es que se compense la disminución de la velocidad de las reacciones con un aumento en la cantidad de enzima que posee el tejido. Obviamente, esta es una mera especulación ya que no se han realizado mas experimentos que avalen esta observación.

Dado que ambas localizaciones poseen distinta afinidad por el sustrato, se quiso analizar si existían diferencias entre ellas en su afinidad por el cofactor NAD^+ . El análisis de la Tabla 31 muestra que ambas localizaciones poseen la misma afinidad por el cofactor. Por otra parte, al evaluar la afinidad de NAD^+ por la 3β -HSD/l queda claramente establecido que en ninguno de los experimentos realizados la disponibilidad de cofactor fue un factor limitante. En todos los casos el cofactor estuvo presente en exceso si se compara la concentración utilizada (0.5 mM) con su K_m . Si bien no mostrados aquí, resultados similares se obtuvieron con la enzima proveniente de ejemplares capturados en otoño-invierno.

Tabla 31

Constantes cinéticas del cofactor (NAD⁺) por la enzima 3βHSD/l mitocondrial y microsomal de interrenal de sapos de primavera-verano.

Enzima	Km ap (μM)	Vmax (nmol/min/mg)
Microsomal	0.64 ± 0.11	0.79 ± 0.07
Mitocondria	0.70 ± 0.13	0.69 ± 0.09

Nota: Todos los experimentos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones saturantes de sustrato (250μM de pregnenolona) y variables de NAD⁺ (0.01-20 μM). Km aparente y Vmax se calcularon por Wilkinson. Los resultados están expresados como la media de 5 experimentos ± error estándar.

Tanto la transformación del análogo de aldosterona en aldosterona como de pregnenolona en progesterona (Tabla 32) se inhibe aproximadamente en un 80% por el agregado de cianocetona, un conocido inhibidor de la enzima de mamíferos y no se registraron diferencias en la inhibición en cuanto a la localización de la enzima.

Tabla 32

Efecto de cianocetona (CNK) sobre la transformación de pregnenolona en progesterona y el análogo de aldosterona en aldosterona.

	Actividad Porcentual	
	Progesterona	Aldosterona
Control	100	100
CNK 10 ⁻⁶	38 ± 5	42 ± 4
CNK 10 ⁻⁵	18 ± 3	16 ± 6

Nota: Las incubaciones se llevaron a cabo utilizando homogenato de interrenal como fuente de enzima. Todos los experimentos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones saturantes de sustrato (250μM de pregnenolona y 50 μM de 5-HAA) y de NAD⁺ (0.5 mM). Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos ± error estándar.

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, la enzima de interrenal de sapo tiene requerimiento estricto de NAD⁺ como cofactor (Tabla 33) y no puede utilizar NADP⁺ (Berko y col., 1986)

Tabla 33

Actividad de 3 β HSD/I frente a distintos cofactores.

	Actividad Porcentual	
	Progesterona	Aldosterona
Control	3	2
NAD ⁺	100	100
NADP ⁺	5	6
NADH	2	5
NADPH	4	5

Nota: Las incubaciones se llevaron a cabo utilizando homogenato de interrenal como fuente de enzima. Todos los experimentos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones saturantes de sustrato (250 μ M de pregnenolona y 50 μ M de 5-HAA). La concentración de los distintos cofactores fue de 0.5 mM. Los resultados están expresados como la media de 4 experimentos \pm error estándar.

Tomados en conjunto estos resultados sugerirían que la 3 β HSD/I mitocondrial catalizaría preferencialmente el camino Δ 5 para la biosíntesis del mineralocorticoide aldosterona en la glándula interrenal. La enzima de localización microsomal participaría en la biosíntesis de progesterona cuya posterior transformación daría origen a corticosterona, el glucocorticoide de esta especie.

EFFECTO DE LA ACLIMATACION A DISTINTAS SALINIDADES SOBRE LA SINTESIS
Y SECRECION DE ALDOSTERONA

Aldosterona es el mineralocorticoide mas importante de esta especie y como tal su regulación depende de la concentración de sodio plasmático como consecuencia también está ligado a la disponibilidad del ión. La piel ventral de sapo es uno de los sitios mas activos para el transporte de sodio (Crabbé, 1961) y la mayor parte de la regulación de dicho ión ocurre a ese nivel y en la vejiga urinaria.

Con el objeto de analizar el efecto que las distintas concentraciones de sodio tienen sobre la biosíntesis de aldosterona en esta especie, se aclimataron animales a distintas salinidades (Jungreiss y Johnston, 1979). Para ello los animales se mantuvieron durante 48 hs sobre 1 cm de solución de NaCl de distintas concentraciones (0.125 y 0.15 M). Una vez finalizado el periodo de aclimatación, se sacrificaron los animales y se realizaron una serie de ensayos.

Se utilizaron animales de verano (diciembre y enero) y de invierno (julio y agosto).

La Tabla 34 muestra la concentración de aldosterona y corticosterona plasmáticas medidas por RIA, previa extracción y separación de los esteroides por HPLC.

Tabla 34

Aldosterona y corticosterona plasmáticas en animales aclimatados a distintas salinidades

Tratamiento	Aldosterona (nmoles/100 ml)		Corticosterona (nmoles/100 ml)	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano
NaCl 0.125 M	0.58 ± 0.26	1.62 ± 0.29	1.92 ± 0.31	1.35 ± 0.18
En tierra	0.64 ± 0.19	1.59 ± 0.38	1.85 ± 0.82	1.41 ± 0.12
NaCl 0.150 M	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.10	1.82 ± 0.71	1.32 ± 0.21

Nota: Las concentraciones de aldosterona y corticosterona están expresadas en nmoles por 100 ml de plasma. Los esteroides fueron cuantificados por RIA previa separación por HPLC. Los valores corresponden en todos los casos a la media de 10 animales ± error estandar.

Como puede observarse en la Tabla 34, cuando los animales se encuentran en un medio ligeramente hipertónico (NaCl 0.15 M), se observa una disminución en la concentración de aldosterona plasmática con respecto a los animales que se encuentran en tierra humedecida o en una solución isotónica de NaCl (0.125 M). Esta disminución alcanza un 90% tanto en animales de verano como de invierno. Por otra parte, los niveles de corticosterona plasmática no se ven afectados, demostrando una marcada disociación en la secreción de uno y otro esteroide. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Jungreiss y Johnston (1979) quienes, trabajando en *Rana pretiosa*, observan una disminución de las concentraciones plasmáticas de aldosterona en función del aumento de la concentración de sodio del medio. También están de acuerdo con aquellos obtenidos para *Rana temporaria*, *Rana catesbiana* y *Bufo marinus* por Crabbé (1961). Por otra parte son, también, consistentes con los obtenidos para mamíferos, en los cuales la sobrecarga salina produce una disminución en la secreción de aldosterona (Edelman y Farnesil, 1974; Sullivan, 1974, entre otros).

Tabla 35

Relaciones aldosterona/corticosterona plasmáticas en animales de distintas épocas del año

Tratamiento	Aldosterona/corticosterona	
	Invierno	Verano
NaCl 0.125 M	0.30 ± 0.08	1.22 ± 0.07
En tierra	0.35 ± 0.09	1.13 ± 0.08
NaCl 0.150 M	0.03 ± 0.01	0.13 ± 0.03

Nota: Los esteroides fueron cuantificados por RIA previa separación por HPLC. Los valores corresponden en todos los casos a la media de 10 animales ± error estandar.

La Tabla 35 muestra la relación entre aldosterona y corticosterona en animales provenientes de distintas épocas del año. La concentración plasmática de corticosterona, en animales de invierno, es mayor que la de aldosterona (mas de dos veces), sin embargo esta

niveles plasmáticos, no se vió afectada por el tratamiento.

Analizados en conjunto estos resultados parecerían indicar que la disminución de aldosterona plasmática se debe a una disminución de la tasa de secreción por parte de la glándula interrenal mas que a un aumento en la velocidad de degradación del esteroide.

Efecto de la aclimatación a distintas salinidades sobre la actividad de la enzima 3 β HSD/I

En secciones anteriores se había caracterizado la enzima de localización mitocondrial como responsable de la transformación de 5-HAA en aldosterona. Dado que los niveles plasmáticos de aldosterona disminuyeron frente a un aumento de la salinidad del medio, mientras que los de corticosterona se mantuvieron constantes, se planteó analizar si existía algún cambio en los parámetros cinéticos de la enzima. Para ello se calcularon los valores de Km y Vmax de la enzima 3 β HSD/I mitocondrial (5-HAA como sustrato) y microsomal (pregnenolona como sustrato) en animales sometidos a NaCl 0.15 M y se los comparó con los obtenidos en animales mantenidos en tierra humedecida.

Las Tablas 37 y 38 contienen los resultados obtenidos.

Tabla 37

Constantes cinéticas de la enzima 3 β HSD/I microsomal de interrenales de sapos sometidos a distintas condiciones de salinidad.

Tratamiento	Epoca	Km ap	Vmax
En tierra	verano	0.73 \pm 0.11	0.81 \pm 0.13
NaCl 0.15 M	verano	0.80 \pm 0.09	0.75 \pm 0.11
En tierra	invierno	0.65 \pm 0.22	1.57 \pm 0.36
NaCl 0.15 M	invierno	0.77 \pm 0.10	1.49 \pm 0.21

Nota: Los ensayos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones constantes de cofactor (NAD⁺ 0.5 mM) y variables de sustrato (0.01 y 50 μ M). Km aparente (μ M) y Vmax (nmoles/min/mg proteínas) se calcularon utilizando la linealización de Wilkinson. Los resultados están expresados como la media de 3 experimentos por triplicado \pm error estándar.

El ANOVA de los resultados presentados en la Tabla 37 indica que no existe efecto del

tratamiento sobre los parámetros cinéticos de la enzima microsomal cuando se utiliza pregnenolona como sustrato. Tal cual lo descrito en secciones anteriores, hay diferencias en la V_{max} entre animales de invierno y verano. Estos resultados son coincidentes con el hecho que el aumento en la concentración de sodio del medio no afectaba la biosíntesis de corticosterona ni sus niveles circulantes. Conviene recordar que se había propuesto que la localización microsomal de la 3β HSD/I participaría en la biosíntesis de progesterona. Esta a su vez es un intermediario de la vía $\Delta 4$ que conduce a la síntesis de corticosterona.

Sin embargo cuando se analizan los mismos parámetros cinéticos de la enzima mitocondrial, utilizando 5-HAA como sustrato, los resultados son distintos. Como puede observarse en la Tabla 38, no hay un efecto significativo del tratamiento sobre la constante de afinidad de la enzima, sin embargo se observa un efecto significativo sobre la V_{max} .

Tabla 38

Constantes cinéticas de la enzima 3β HSD/I mitocondrial de interrenales de sapos sometidos a distintas condiciones de salinidad.

Tratamiento	Epoca	Km ap	V_{max}
En tierra	verano	0.84 ± 0.13	0.55 ± 0.12^a
NaCl 0.15 M	verano	0.73 ± 0.09	0.15 ± 0.02
En tierra	invierno	0.77 ± 0.12	0.31 ± 0.10^a
NaCl 0.15 M	invierno	0.82 ± 0.10	0.09 ± 0.03

Nota: Los ensayos (28°C, pH 7.4) se llevaron a cabo con concentraciones constantes de cofactor (NAD^+ 0.5 mM) y variables de sustrato (0.01 y 50 μM). Km aparente (μM) y V_{max} (nmoles/min/mg proteínas) se calcularon utilizando la linealización de Wilkinson. Los resultados están expresados como la media de 3 experimentos por triplicado \pm error estándar. (a): diferencias significativas $p < 0.01$ entre los animales mantenidos en tierra humedecida y los mantenidos en NaCl 0.15 M.

La aclimatación de los animales a un medio con sodio moderadamente elevado produce una disminución significativa de la V_{max} de la enzima mitocondrial indicando que el aumento de sodio podría estar modificando la cantidad de enzima presente en el tejido o bien la cantidad de enzima activa presente en las mitocondrias. Este fenómeno es semejante,

aunque de sentido inverso, al observado en ratas sometidas a una sobrecarga de potasio o a una deficiencia de sodio. En estas ratas se observa un aumento de la expresión de una enzima que participa en la biosíntesis de aldosterona, el citocromo P450 11 β -hidroxilasa (Tremblay y Lehoux, 1992; Yagci y Müller, 1996). Si bien es una enzima distinta en un modelo animal diferente, podría establecerse una homología interesante en cuanto a la regulación de la secreción de aldosterona por la concentración de iones como sodio y en el caso de la rata, potasio.

Conclusiones

CONCLUSIONES

BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA

Los estudios sobre la biosíntesis de aldosterona a partir de distintos sustratos nos permiten concluir lo que se detalla a continuación.

➤ En nuestro laboratorio se había demostrado previamente que la 18-OH-B podía ser sustrato para la síntesis de aldosterona cuando se lo utilizaba como precursor, no en su forma original "M", sino transformado en una forma menos polar (L) cuyo $R_f(s=18\text{-OH-B "M"})$ en el sistema Bush B5 es 4.33 (Aragonés y col., 1975; Cozza y col., 1985, 1987). La forma original de la hormona posee muy baja capacidad precursora del mineralocorticoide. La transformación de 18-OH-B en su forma menos polar se consigue espontáneamente en medio ácido a partir de pH 4. Si bien este pH parece no ser fisiológico desde un punto de vista clásico, hay evidencias que muestran que dependiendo de la composición lipídica de las membranas (y las enzimas esteroideogénicas son en su mayoría de membrana) en la interfase pueden encontrarse valores de pH muy bajos (cerca de 4) (para una revisión ver Maggio, 1994).

A diferencia de lo que ocurre con la 18-OH-B comercial o de rata, la proveniente de interrenales de sapo, presenta una forma menos polar única y distinta de las conocidas hasta el momento. La forma obtenida posee un $R_f=0.40$. Este hecho es inexplicable hasta el momento por cuanto debería esperarse que la hormona (dado que es aparentemente la misma) tuviera un comportamiento similar al de la forma comercial.

En anfibios en general y en el sapo en particular existen muy pocos trabajos en la literatura acerca de la capacidad precursora de 18-OH-B. Este esteroide ya había sido caracterizado en *Rana catesbeiana*, luego de ser aislado a partir de incubaciones con progesterona- C^{14} (Ulick y Kusch, 1960; Ulick y col., 1964; Nicolis y Ulick, 1965). Estos autores encontraron que al incubar progesterona- C^{14} con interrenales de la especie estudiada podían aislarse 18-hidroxycorticosterona y aldosterona, lo cual sugirió que progesterona podría ser un intermediario en su síntesis. Estos resultados difieren de los obtenidos en *Bufo arenarum*, en el cual solo se obtienen altos rendimientos de 18-OH-B y aldosterona utilizando pregnenolona como precursor (Ceballos y col., 1983).

Con respecto a la precursoridad de aldosterona que posee este esteroide 18-hidroxilado, los resultados mostrados permitirían en principio descartar a esta hormona como intermediario para

la biosíntesis de aldosterona en la glándula interrenal de *Bufo arenarum*, por lo menos en las condiciones utilizadas para los experimentos presentados en esta Tesis. Esto difiere de lo hallado en *R. catesbeiana*, especie en la que se obtuvo una muy pequeña transformación de 18-OH-B a aldosterona (menor a 1%), aunque significativa si se la compara con controles sin tejido interrenal (Ulick y col., 1964; Nicolis y Ulick, 1965). Esto podría deberse, tal vez, no solo a la baja precursoridad que en general tiene 18-OH-B en las distintas especies estudiadas, sino también a que la vía $\Delta 4$ no es un camino de síntesis predominante en la formación de aldosterona en esta especie (Ceballos y col., 1992).

➤ Se realizaron solo algunos experimentos acerca de la capacidad precursora de aldosterona que tiene corticosterona. Los resultados obtenidos son coincidentes con los ya descritos para *B. arenarum* (Ceballos y col., 1983). La capacidad biosintética de este conocido intermediario en la síntesis de aldosterona también es muy baja. Nuevamente plantea una discrepancia con la otra especie de anuros estudiada intensivamente. Psychoyos y col. (1966) hicieron estudios sobre la transformación de corticosterona a aldosterona, y estudiaron también el requerimiento de cofactores de la transformación (Tallan y col., 1967; Greengard y col., 1967). Encontraron que la síntesis de aldosterona se lleva a cabo en mitocondrias (Psychoyos y col., 1966) y requiere del agregado de NADPH y oxígeno molecular o bien de NADP⁺ y alguno de los intermediarios del ciclo de Krebs que puedan generar NADPH intramitocondrial (Tallan y col., 1967). Resultados similares fueron encontrados por otros grupo de investigación también en *R. catesbeiana* (Mehdi y Carballeira, 1971b). En el caso de *B. arenarum*, podríamos encontrar nuevamente con una marcada diferencia respecto a la rana en cuanto a la capacidad precursora de aldosterona que posee un intermediario de la vía $\Delta 4$.

➤ Como ya se detalló en la Introducción, el compuesto "N" se obtuvo por primera vez incubando cortes de tejido interrenal de *B. arenarum* a 28°C y a partir de pregnenolona-H³ como precursor. Los resultados de esta Tesis muestran que se trata de un esteroide muy polar, con movilidad intermedia entre 18-OH-B y cortisol en el sistema Bush B5, descartándose que se tratara de cortisol, esteroide, que como ya se mencionara, esta especie no produce (Ceballos y col., 1983). El esteroide "N", ligeramente más polar que cortisol en los sistemas cromatográficos Bush B₅ y Cy:Di I, co-migra con 19-OH-B radioinerte en esos mismos sistemas. Sin embargo, luego de ser acetilado y cromatografiado en el sistema Bush A, el acetato de "N" da lugar a un pico de R_f 0.24 mientras que el acetato de 19-OH-B tiene un R_f de 0.14, indicando que se trata de compuestos distintos. Se descartó de esta manera que el compuesto "N" fuera 19-OH-B, esteroide cuya presencia fuera descrita por primera vez para adrenal bovina (Neher, 1963). El

tratamiento en medio ácido y alcalino permitió descartar "N" fuera una forma particular de 18-OH-B ni de otro esteroide con un hidroxilo en la posición C-18 como 18-hidroxi-11 β desoxicorticosterona. La acetilación del compuesto "N" durante distintos y temperaturas llevó a concluir que el compuesto "N" parece poseer por lo menos tres sitios susceptibles de ser acetilados; los sitios mencionados poseerían distinta accesibilidad y; uno de ellos parecería estar ubicado en la posición C3 (con alto grado de exposición), tal cual surge de los resultados obtenidos al acetilar durante 6 hs a temperatura ambiente.

Cuando se estudiaron las propiedades biosintéticas del compuesto "N", este esteroide demostró ser un muy buen precursor para la síntesis de aldosterona. Por otra parte, en el sistema Bush B5 en el que fueron originalmente procesados los productos de la incubación, no fue posible encontrar ningún otro esteroide distinto de aldosterona. Por otra parte cuando "N" fue incubado con la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa comercial, a pH 8.9 se transformó en un esteroide menos polares. El esteroide utilizado como control, pregnenolona también dio lugar a un esteroide de menor polaridad que ella misma así como también menos polar que progesterona. Esta forma menos polar co-migra con el correspondiente estandar radioinerte (5-pregnen-3,20-ona). Estos resultados confirmaron que el compuesto "N" poseía un hidroxilo en la posición C-3.

Cuando se analizó el requerimiento de cofactores para la conversión de "N" en aldosterona, se observó que solamente NAD⁺ podía ser utilizado como cofactor, mientras que ninguno de los otros cofactores ensayados estimulaba la biosíntesis de aldosterona significativamente respecto del control sin cofactor. Estos resultados sumados a que cianocetona (inhibidor de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa, 3 β HSD/I) disminuían significativamente la biosíntesis de aldosterona permitieron postular que la transformación de "N" a aldosterona estaría mediada por la enzima 3 β HSD/I, que como se mencionara en la Introducción requiere NAD⁺ como cofactor (Edwards y *col.*, 1976; Ishii-Ohba y *col.*, 1986a y b) y se inhibe competitivamente por CNK.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento sugerirían que el compuesto "N" podría ser el 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona, que se transformaría en aldosterona por acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa.

Esto fue confirmado posteriormente por la caracterización de "N" por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa.. El análisis del derivado trimetil silil eter-metil oxima (TMS-MO) y trimetil

silil eter (TMS) del compuesto "N", permitió la identificación provisoria del compuesto "N" como el 3 β -hidroxi-5-ene analogo de aldosterona. Dicha caracterización provisoria fue confirmada al analizar los derivados TMS-MO y TMS del esteroide de referencia 3 β ,11 β ,21-trihidroxi-5-pregnen-20-ona-18-al por CGL-M. El mismo fué sintetizado por el Dr. Marcel Hamik de la Universidad de Tel Aviv, Israel (Hamik y col., 1985). Tanto los derivados TMS-MO como TMS del esteroide mencionado dan los mismos tiempos de retención que los picos mayoritarios del compuesto "N". Los espectros de masa del standard son idénticos a los del compuesto "N".

Todos los resultados obtenidos hasta aquí, nos permitieron identificar al compuesto "N" como el 3 β -hidroxi análogo de aldosterona (3 β ,11 β ,21-trihidroxi-20-oxo-5-pregnen-18-al). Estos resultados, sumados a la importante capacidad precursora de aldosterona que posee "N", a la menor precursoridad de corticosterona y a la falta de capacidad de 18-OH-B, indicarían que en *Bufo arenarum*, la isomerización del doble enlace Δ 5 a Δ 4 es un paso muy tardío en el camino biosintético de aldosterona.

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA- Δ 4 ISOMERASA EN INTERRENALES DE SAPO.

Ya confirmadas las evidencias previas que indicaban la existencia de un camino Δ 5 para la biosíntesis de aldosterona en la interrenal del sapo *Bufo arenarum*, y establecido que el 3 β -hidroxi análogo de aldosterona era mejor precursor para la biosíntesis de aldosterona (por lo menos en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis) que corticosterona y 18-hidroxycorticosterona (ambos intermediarios conocidos del camino Δ 4 en numerosas especies), se emprendió el estudio de la enzima 3 β HSD/I. En el sapo, la 3 β HSD/I (por establecer en que punto de la vía de síntesis comienza el camino Δ 4) podría ser regulada para la "elección" entre un camino biosintético u otro (Δ 4 vs Δ 5) en función de los requerimientos de corticosterona ó de aldosterona. No existían antecedentes en la literatura acerca de la actividad de esta enzima en interrenales de anfibios ni acerca de su posible papel regulatorio. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo permitieron concluir que dicha enzima presenta dos localizaciones posibles, una mitocondrial y la otra microsomal cuando se estudia su distribución en animales de primavera-verano. En la fracción mitocondrial se la puede encontrar asociada a la membrana interna conjuntamente con la actividad de succínico deshidrogenasa. Esta doble localización es semejante a la descrita para placenta humana (Csapo, 1977; Thomas y col., 1988; Genti Raimondi y col., 1989; Thomas y col., 1989), en la cual la enzima de localización mitocondrial

catalizaría fundamentalmente la conversión de dehidroepiandrosterona en androstenediona que es un androgeno aromatizable. Cuando se analizó la distribución de la actividad enzimática en adrenales de pollo y de rata, la misma aparece asociada solo a la fracción microsomal tal como fuera descrito por otros investigadores para adrenal y testículo (Ishii-Ohba y *col.*, 1986a y b; Yates y Deshpande, 1975) y mitocondriales y microsomales en adrenales de vaca (Cherradi y *col.*, 1994). En este último grupo, la enzima de localización microsomal posee mas afinidad por 17α -hidroxiprogesterona, un conocido intermediario del camino $\Delta 5$ que conduce a la biosíntesis de cortisol (glucocorticoide de esta especie). La de localización mitocondrial posee mayor afinidad por pregnenolona e iniciaría el camino $\Delta 4$ que conduce, en bovinos, a la biosíntesis de aldosterona.

La distribución subcelular de la actividad de 3β HSD/I así como la de los marcadores correspondientes en animales recolectados durante el periodo de otoño-invierno muestra que a semejanza de lo observado con animales de primavera-verano la enzima se localiza en ambas fracciones subcelulares. Sin embargo, es destacable que la actividad de la 3β HSD/I microsomal es mayor que en las interrenales provenientes de animales sometidos a temperaturas mas elevadas, lo cual parece ser coincidente con la aparente mayor actividad de la vía $\Delta 4$ involucrada en la biosíntesis de corticosterona en los animales de invierno (Ceballos y *col.*, 1992). Por otra parte, la enzima mitocondrial posee menor actividad que la enzima microsomal. Dado que la actividad mitocondrial parece disminuir se especuló con que esa localización podría estar involucrada con la biosíntesis de aldosterona y la microsomal con la de corticosterona. Como consecuencia de decidió estudiar las constantes cinéticas de la enzima de ambas localizaciones para pregnenolona y el 3β -hidroxi analogo de aldosterona (5-HAA). Si bien ambas localizaciones poseen una V_{max} semejante cuando se trabaja con tejido proveniente de animales de primavera-verano, el K_m ap. de la enzima mitocondrial es mucho mayor, lo cual indicaría una menor afinidad por pregnenolona. Estas diferencias de afinidad entre ambas localizaciones se mantienen en animales de otoño-invierno. Sin embargo, la situación es diferente cuando analizamos la V_{max} , que es un indicador de la cantidad de enzima presente en la preparación. En los animales de otoño-invierno se observa una disminución significativa de la V_{max} de la enzima mitocondrial y un aumento, también significativo, de dicho parámetro cinético en la localización microsomal.

Se podría suponer que, en épocas de baja temperatura ambiente y por consiguiente de disminución en la cinética de los procesos (no hay que olvidar que se habla de animales

poiquilotermos), el sistema compensa aumentando la cantidad de enzima disponible para catalizar la biosíntesis de progesterona. Progesterona es un intermediario del camino $\Delta 4$ que conduce a la biosíntesis de corticosterona, que es el glucocorticoide de esta especie. Hazel y Prosser (1974) han sugerido que las alteraciones del metabolismo en compensación a los cambios de temperatura pueden deberse, entre otras cosas, a cambios cuantitativos en la síntesis de enzimas o isoenzimas, síntesis de isoenzimas específicas de temperatura, cambios inducidos por la temperatura en el ambiente intracelular y extracelular que afectan la actividad catalítica y cambios conformacionales en las enzimas unidas a membrana, provocados por cambios en la composición lipídica de la bicapa.

Para corroborar el supuesto que la enzima de localización mitocondrial cataliza la transformación del 5-HAA en aldosterona, se analizaron los mismos parámetros cinéticos utilizando este intermediario como sustrato. Si bien los valores de V_{max} , así como sus variaciones en las distintas épocas del año son semejantes a las determinadas utilizando pregnenolona como sustrato, se observa notorias diferencias en el K_m ap. Cuando se utiliza 5-HAA como sustrato los valores de afinidad se modifican, la localización mitocondrial posee un K_m mucho menor que la microsomal. Estos resultados permiten concluir que esa localización podría estar involucrada en la biosíntesis de aldosterona a partir de 5-HAA y como consecuencia determinaría la vía $\Delta 5$ para la síntesis del mineralocorticoide.

En forma general podríamos decir que en las adrenales de rata (Kraulis y Birmingham, 1964; Lantos y *col.*, 1967; Peron y McCarthy, 1968), las de aves (Pedemera y Lantos, 1973) y, en general (Sandor, 1969), las adrenales que no 17-hidroxilan o sólo lo hacen en pequeña medida, carecen de una vía $\Delta 5$ importante y no poseen 3β -HSD/I de localización mitocondrial.

EFFECTO DE LA ACLIMATACION A DISTINTAS SALINIDADES SOBRE LA SINTESIS Y SECRECION DE ALDOSTERONA

Aldosterona es el mineralocorticoide más importante de esta especie y como tal su regulación depende de la concentración de sodio plasmático y, como consecuencia, también está ligada a la disponibilidad del ión. Cuando se analizó el efecto que un aumento en la concentración de sodio tiene sobre la biosíntesis de aldosterona se observó una disminución en la concentración de aldosterona plasmática con respecto a los animales que se encuentran en tierra humedecida o en una solución isotónica de NaCl (0.125 M). Esta disminución alcanza un 90% tanto en animales de verano como de invierno mientras que los niveles de corticosterona plasmática no se ven afectados, demostrando una marcada

disociación en la secreción de uno y otro esteroide. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en *Rana pretiosa* (Jungreiss y Johnston, 1979), en *Rana catesbeiana* (Ulick y Feinholtz, 1968; Davis y col., 1970; Braverman y col., 1973) y en *Bufo marinus* (Crabbé, 1961). Por otra parte son, también, consistentes con los obtenidos para mamíferos, en los cuales la sobrecarga salina produce una disminución en la secreción de aldosterona (Edelman y Farnesil, 1974; Sullivan, 1974, entre otros).

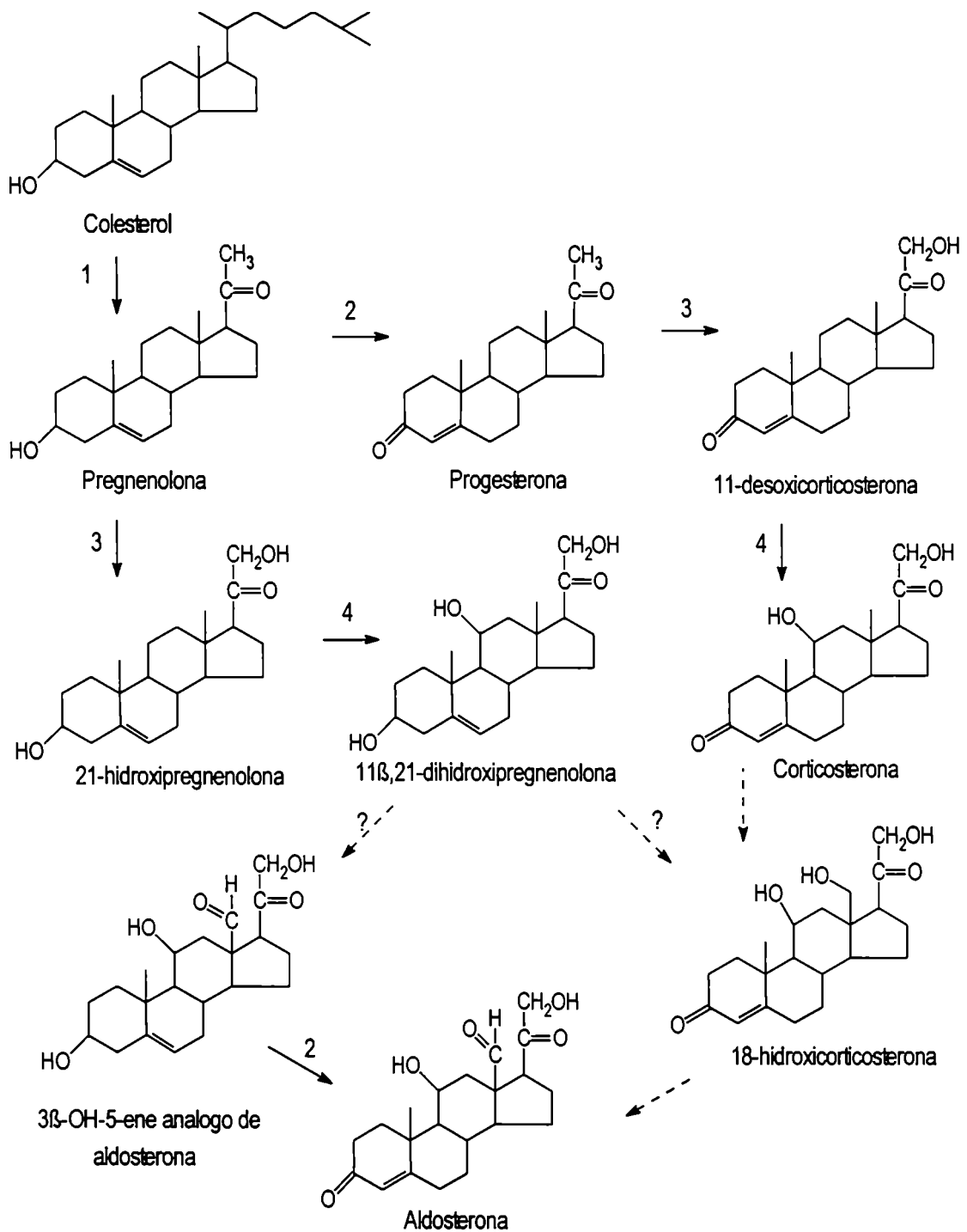
La concentración plasmática de corticosterona, en animales de invierno, es mayor que la de aldosterona sin embargo esta relación se invierte cuando las determinaciones se llevaron a cabo en plasmas provenientes de animales de verano. Este aumento en los niveles plasmáticos de aldosterona podría estar relacionado con el mayor requerimiento de mineralocorticoides en animales que, por las condiciones del medio ambiente, podrían estar sujetos a mayor pérdida de sodio. Por otra parte, la secreción de aldosterona por parte de la interrenal también disminuyó drásticamente con el aumento de la concentración de sodio del medio mientras que la de corticosterona no se vio afectada. Este efecto se observó tanto en animales de verano como de invierno. Analizados en conjunto estos resultados parecerían indicar que la disminución de aldosterona plasmática se debe a una disminución de la tasa de secreción por parte de la glándula interrenal mas que a un aumento en la velocidad de degradación del esteroide.

Dado que los niveles plasmáticos de aldosterona disminuyeron frente a un aumento de la salinidad del medio, mientras que los de corticosterona se mantuvieron constantes, se planteó analizar si existía algún cambio en los parámetros cinéticos de la enzima 3β HSD/I. Si bien no existe un efecto mensurable sobre los parámetros cinéticos de la enzima microsomal cuando se utiliza pregnenolona como sustrato cuando el sustrato utilizado es 5-HAA los resultados son distintos. La aclimatación de los animales a un medio con sodio moderadamente elevado produce una disminución significativa de la V_{max} de la enzima mitocondrial indicando que el aumento de sodio podría estar modificando la cantidad de enzima presente en el tejido o bien la cantidad de enzima activa presente en las mitocondrias. Estos resultados son coincidentes con el hecho de que el aumento en la concentración de sodio del medio no afectaba la biosíntesis de corticosterona ni sus niveles circulantes. Conviene recordar que se había propuesto que la localización microsomal de la 3β HSD/I participaría en la biosíntesis de progesterona. Esta a su vez es un intermediario de la vía $\Delta 4$ que conduce a la síntesis de corticosterona. Este fenomeno es semejante, aunque de sentido inverso, al

observado en ratas sometidas a una sobrecarga de potasio o a una deficiencia de sodio. En estas ratas se observa un aumento de la expresión de una enzima que participa en la biosíntesis de aldosterona, el citocromo P450 11 β -hidroxilasa (Tremblay y Lehoux, 1992; Yagci y Müller, 1996). Si bien es una enzima distinta en un modelo animal diferente, podría establecerse una homología interesante en cuanto a la regulación de la secreción de aldosterona por la concentración de iones como sodio y en el caso de la rata, potasio.

La Figura 8 muestra un resumen del camino de síntesis de aldosterona. Esta vía incluye al 3 β -hidroxi análogo de aldosterona como el intermediario inmediatamente anterior en la biosíntesis del mineralocorticoide.

Figura 8



Nota: 1: citocromo P450scc ; 2: 3β-hidroiesteroide deshidrogenasa/isomerasa; 3: 21-hidroxilasa; 4: 11β-hidroxilasa

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Ames, B.N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.*, VIII, 115-118.
- Aragonés, A., Gros, E.G., Lantos, C.P. (1975). Less polar forms and derivatives of 18 hydroxy-corticosterone. *J. Steroid Biochem.*, 9, 175-180.
- Aronson, N.N. and Touster, O. (1974). Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol.*, XXXI, 90-94.
- Benyamina, M., Leboulenger, F., Lihmann, I., Delarue, C., Feuilloley, M. and Vaudry, H. (1987). Acetylcholine stimulates steroidogenesis in isolated frog adrenal gland through muscarinic receptors: Evidence for a desensitization mechanism. *J. Endocrinol.*, 113, 339-348.
- Berka, J.L., Kelly, D.J., Robinson, D.B., Alcom, D., Marley, P.D., Femley, R.T. and Skinner, S.L. (1996). Adrenaline cells of the rat adrenal cortex and medulla contain renin and prorenin. *Mol. Cell Endocrinol.*, 119, 175-184.
- Berko, E.A., Thomas, J. and Strickler, R.C. (1986). 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human placental microsomes and mitochondria: Co-solubilization of androstene and pregnene activities *Steroids*, 47, 351-363.
- Berko, E.A., Thomas, J.L. and Strickler, R.C. (1987). A modified digitonin-precipitation radioassay for 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase. *Analyt. Biochem.*, 163, 36-41.
- Bjorkhem, I. and Kalmar, K.E. (1977). 18-hydroxylation of DOC by reconstructed systems from rat and bovine adrenals. *Eur. J. Biochem.*, 51, 141-157.
- Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., Usadel, H., Bockmann, M. and Scherbaum, W.A. (1991). Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res.*, 265, 1-9.
- Bornstein, S.R., Gonzalez-Hernandez, J.A., Ehrhart-Bornstein, M., Adler, G. and Scherbaum, W.A. (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 225-232.
- Brattstrom, B.H. (1960). The role of evaporative cooling as a thermoregulatory device in

tropical amphibians. *Yr. Bk. Am. Philos. Soc.*, **1959**, 225-226.

- Brattstrom, B.H. (1963). A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology*, **44**, 238-255.
- Brattstrom, B.H. (1968). Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 93-111.
- Brattstrom, B.H. (1970). Thermal acclimation in australian amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, **35**, 69-103.
- Brattstrom, B.H. (1979). Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. *Amer. Zool.*, **19**, 345-356.
- Braverman, B., Davis, J.O. and Taylor, A.A. (1973). Sodium depletion and postcaval vein constriction on steroid secretion in the bullfrog. *Am. J. Physiol.*, **224**, 1358-1362.
- Bush, I.E. (1952). Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. *Biochem. J.*, **50**, 370-378.
- Bush, I.E. and Willoughby, M. (1957). The excretion of allotetrahydrocortisol in human urine. *Biochem. J.*, **67**, 689-700.
- Carstensen, H., Burguers, A.C.J. and Li, C.H. (1959). Isolation of aldosterone from incubates of adrenals of the American bullfrog and stimulation of its production by mammalian adrenocorticotropin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 4109-4110.
- Carstensen, H., Burguers, A.C.J. and Li, C.H. (1961). Demonstration of aldosterone and corticosterone as the principal steroids formed in incubates of adrenals of the American bullfrog (*Rana catesbiana*) and stimulation of their production by mammalian adrenocorticotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **1**, 37-50.
- Ceballos, N.R. and Lantos, C.P. (1992). Corticoidogenesis in *Bufo arenarum* H. In vitro biosynthesis of pregnenolone and corticosterone metabolites at low temperature incubations. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **88**, 132-139.
- Ceballos, N.R., Cozza, E.N., and Lantos, C.P. (1983). Corticoidogenesis in *B. arenarum* H. I. In vitro biosynthesis of ³H-pregnenolone and ³H-corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28 C and 37 C. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **51**, 138-147.
- Chan, S.T.H. and Edwards, B.R. (1970). Kinetic studies on the biosynthesis of

corticosteroids *in vitro* from exogenous precursors by the interrenal glands of the normal, corticotrophin-treated and adenohipophysectomized *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.*, **47**, 183-195.

➤ Chan, S.W.C., Vinson, G.P. and Phillips, J.G. (1969). Pathway for the biosynthesis of corticosteroids from pregnenolone by adrenal tissue of the frog, *Rana rugulosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **12**, 644-650.

➤ Chan, S.W.C. and Phillips, J.G. (1971). Seasonal variations in production *in vitro* of corticosteroids by the frog (*Rana rugulosa*) adrenal. *J. Endocrinol.*, **50**, 1-17.

➤ Cherradi, N., Guidicelli, C., Defaye, G. and Chambaz, E.M. (1992). Purification and characterization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase from bovine adrenal cortex. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 831-836.

➤ Cherradi, N., Defaye, G. and Chambaz, E.M. (1994). Characterization of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology*, **134**, 1358-1364.

➤ Chester-Jones, I. (1957). Amphibia. In: The adrenal cortex. University Press. Cambridge. London, pp. 146-167.

➤ Chester-Jones, I., Phillips, J.G. and Holmes, W.N. (1959). Comparative Physiology of the adrenal cortex. In: "Comparative Endocrinology". (A. Gorbman, ed.), Wiley, New York, pp.582-612.

➤ Clarke, T., Bain, P., Sha, L.L. and Payne, A. (1993). Enzyme characteristics of two distinct forms of mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase cDNA expressed in COS-1 cells. *Endocrinology*, **132**, 1971-1976.

➤ Conlon, J.M., O'Harte, F., Smith, D.D., Tonon, M.C. and Vaudry, H. (1992). Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 578-583.

➤ Cossins, A.R. and Prosser, C.L. (1978). Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2040-2043.

➤ Cozza, E.N., Ceballos, N.R., Gonzalez, C.B., Aragonés, A. y Lantos, C.P. (1983). Determination of progesterone and corticosterone contents of steroidogenic tissues by a recycling HPLC technique. A critical study of collection conditions. *Anal. Asoc. Quím. Arg.*, **71**,

509-521.

- Cozza, E.N., Burton, G., Ceballos, N.R., Lantos, C.P., Harnik, M. and Scott, I. (1985). Eighteen-deoxyaldosterone and other less polar forms of 18-hydroxycorticosterone as aldosterone precursors in rat adrenals. *J. Steroid Biochem.*, **22**, 665-672.
- Cozza, E.N., Lantos, C.P. and Burton, G. (1985). A highly lipophilic form of aldosterone. Isolation and characterization of and aldosterone dimer. *J. Steroid Biochem.*, **23**, 511- 516, 1985.
- Cozza, E.N., Ceballos, N.R., Vila, M.C. and Lantos, C.P. (1987). Convertibility of a saponifiable lipoidal derivative of 18-hydroxycorticosterone. *J. Steroid Biochem.*, **28**, 543-547.
- Crabbé, J. (1961). Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. *Endocrinology*, **69**, 673-682.
- Crabbé, J. (1963). Nature and metabolism of adrenocortical secretion in the toad *Bufo marinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**, 692-693.
- Cravioto, M.D., Ulloa-Aguirre, A., Bermudez, J.A., Herrera, J., Lisker, R., Mendez, J.P. and Perez-Palacios, G. (1986). A new inherited variant of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase deficiency syndrome: evidence for the existence of two isoenzymes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 360-367.
- Crawshaw, L.I. (1979). Responses to rapid temperature changes in vertebrate ectotherms. *Amer. Zool.*, **19**, 225-237.
- Csapo, A.S. (1977). The "sea-saw" theory of parturition. In *The Fetus and Birth* (Ed. by T. Knight and M. O'Connor). Elsevier, Amsterdam, Vol. **47**, 159-210.
- Damasco, M.C. and Lantos, C.P. (1975). The existence of two interconvertible forms of 18-hydroxycorticosterone, Is one of them an active precursor of aldosterone. *J. Steroid Biochem.*, **6**, 69-74.
- Davidson, S.J. and Talalay, P. (1966). Purification and mechanism of action of a steroid Δ^4 -5 β -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **241**, 906-915.
- Davis, J.O., Copeland, D.L., Taylor, A.A. and Baumer, J.S. (1970). Plasma electrolyte concentrations and steroid secretion in the bullfrog and opossum. *Am. J. Physiol.*, **219**, 555-559.
- De Costa, J., Alonso-Bedate, M. and Fraile, A. (1979). Temperature acclimation in amphibians: changes in lactate dehydrogenase activities and isoenzyme patterns in

Discoglossus pictus pictus (Oth.) tadpoles. *Acta Embryol. Exp.*, **3**, 233-243.

- De Costa, J., Alonso-Bedate, M. and Fraile, A. (1981). Temperature acclimation in amphibians: changes in lactate dehydrogenase activities and isoenzyme patterns in several tissues from adult *Discoglossus pictus pictus* (Oth.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **70 B**, 331-339.
- Delarue, C., Tonon, M.C., Leboulenger, F., Jegou, S., Leroux, P. and Vaudry H. (1979). *In vitro* study of frog (*Rana ridibunda* Pallas) interrenal function by use of a simplified perfusion system. II. Influence of adrenocorticotropin upon aldosterone production. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **38**, 399-409.
- Delarue, C., Perroteau, I., Leboulenger, F., Netchitailo, P., Leroux, P., Jegou, S., Belanger, A., Tonon, M.C. and Vaudry, H. (1981a). *In vitro* effect of prostaglandins on corticosterone and aldosterone production by frog interrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 769-777.
- Delarue, C., Netchitailo, P., Leboulenger, F., Perroteau, I., Rouillet, M., Kusmierck, M.C., Capron, M.H. and Vaudry, H. (1981b). *In vitro* study of frog (*Rana ridibunda* Pallas) interrenal function by use of a simplified perfusion system. VI. Inhibition of aldosterone biosynthesis by SC 14266. *J. Steroid Biochem.*, **15**, 343-348.
- Delarue, C., Lefebvre, H., Idres, S., Leboulenger, F., Homo-Delarche, G., Lihmann, I., Feuilloley, M. and Vaudry, H. (1988). Serotonin stimulates corticosteroid secretion by frog adrenocortical tissue *in vitro*. *J. Steroid Biochem.*, **29**, 519-525.
- Delarue, C., Delton, I., Fiorini, F., Homo-Delarche, F., Fasolo, A., Braquet, P. and Vaudry, H. (1990). Endothelin stimulates steroid secretion by frog adrenal gland *in vitro*: evidence of the involvement of prostaglandins and extracellular calcium in the mechanism of action of endothelin. *Endocrinology*, **127**, 2001-2008.
- Dominguez, O.V. (1965). The presence of two interconvertible forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone. *Steroids* (Supl 2), 29-49.
- Driedzic, W. and Gesser, H. (1994). Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrates hearts: Hypoxia, acidosis, and low temperature. *Physiol. Rev.*, **74**, 221-258.
- Dupont, W., Leboulenger, F., Vaudry, H. and Vaillant, R. (1976). Regulation of aldosterone secretion in the frog *Rana esculenta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 51-60.
- Dupont, E., Labrie, F., Luu-The, V. and Pelletier, G. (1992). Immunocytochemical

localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.*, **74**, 994-998.

- Edelman, I.S. and Farnestil, D.D. (1974). Mineralocorticoids. In *Biochemical actions of hormones*. Vol. 1 (Edited by Litwak), pp. 321-363. Academic Press. New York.
- Edwards, D.P., O'Conner, J.L., Bransome Jr., E.D. and Braselton Jr., W.E. (1976). Human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Δ^5 -isomerase. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1632-638.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A. and Vinson, G.P. (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.*, **19**, 101-143.
- Everse, J. and Kaplan, N.O. (1975). Isoenzymes II: Physiological function. (C.L. Market, ed.), Academic Press, New York, p. 29-43.
- Edwald, W., Werbin, H. and Chaicoff, I.L. (1964). Evidence for two substrate-specific Δ^5 -3-ketosteroid isomerases in beef adrenal gland, and their separation from 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 199-201.
- Farnesil, D.D. and Edelman, I.S. (1966). Characteristics of the renal nuclear receptors for aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 872-879.
- Feuilloley, M., Netchitailo, P., Lihmann, I. and Vaudry, H. (1986). Effect of vinblastine, a potent antimicrotubular agent on steroid secretion by perfused frog adrenal gland. *J. Steroid Biochem.*, **25**, 143-147.
- Feuilloley, M., Netchitailo, P., Delarue, C., Lihmann, I. and Vaudry, H. (1987). Formation of 11 β -hydroxysteroids requires the integrity of the microfilament network in adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 1354-1362.
- Feuilloley, M., Stolz, M., Delarue, C., Fauchere, J.L. and Vaudry, H. (1990). Structure-activity relationships of monomeric and dimeric synthetic ACTH fragments in perfused frog adrenal slices. *J. Steroid Biochem.*, **35**, 583-592.
- Feuilloley, M., Lesouhaitier, O., Delarue, C., De Marchis, S., Conlon, J.M., Bern, H.A. and Vaudry, H. (1994). In vitro study of the effect of urotensin II on corticosteroid secretion in the frog *Rana ridibunda*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **48**, 287-292.
- Fleischer, S., Mc Intyre, J.O. and Vidal, J.C. (1979). Large-scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. *Methods Enzymol.*, **55**, 32-39.

-
- Fraser, R. and Lantos, C.P. (1978). 18-hydroxycorticosterone: a review. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 273-294.
 - Fustinoni, O. y Porto, J. (1938). Morfología de las glándulas adrenales del sapo *Bufo arenarum* (Hensel). *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **14**, 315-320.
 - Gallardo, J.M. (1962). Especiación en tres *Bufo* neotropicales (Amphibia, Anura). *Papeis Avulsos do Dpto. Zool.*, **17**, 57-75.
 - Gallo-Payet, N., Pothier, P. and Isler, H. (1987). On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible rol in adrenocortical function. *Biochem. Cell Biol.*, **65**, 588-592.
 - Genti Raimondi, S., Olivier, N., Patrino, L. and Flury, A. (1989). Regulation of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissue fragments and microsomes from human term placenta: Kinetic analysis and inhibition by steroids. *J. Steroid Biochem.*, **32**, 413-420.
 - Gerschenfeld, H.M., Tramezzani, J.H. and De Robertis, E. (1960). Ultrastructure and function in neurohypophysis of the toad. *Endocrinology*, **66**, 741-762.
 - Gomez-Sanchez, C.E., Murry, B.A., Kem, D.C. and Kaplan, N.M. (1975). A direct radioimmunoassay of serum corticosterone in the rat. *Endocrinology*, **96**, 796-798.
 - Gomez-Sanchez, C.E., Foecking, M.F., Ferris, M.W., Chavari, M.R., Uribe, L. and Gomez-Sanchez, E.P. (1987). The production of monoclonal antibodies against aldosterone. *Steroids*, **49**, 581-587.
 - Greengard, P., Psychoyos, S., Tallan, H.H., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. and Eastbrook, R.W. (1967). Aldosterone synthesis by adrenal mitochondria. III. Participation of cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 298-303.
 - Hanke, W. and Weber, K. (1964). Physiological activity and regulation of the anuran adrenal cortex (*Rana temporaria* L). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **4**, 662-672.
 - Harnik, M., Kashman, Y., Aharonowitz, Y. and Morris, D.J. (1985). Synthesis of 19-hydroxyaldosterone and the 3 β -hydroxy-5-ene analog of aldosterone, active mineralocorticoids. *J. Steroid Biochem.*, **23**, 207-218.
 - Hazel, J.R. and Prosser, C.L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.*, **54**, 620-627.
 - Hazel, J.R., Garlick, W.S. and Sellner, P.A. (1978). The effect of assay temperature upon the pH optima of enzymes from poikilotherms: a test of the imidazole alaphastat hypothesis. *J.*

Comp. Physiol., **123**, 97-104.

- Ho, M.M. and Vinson, G.P. (1993). 11β -hydroxylase gene expression in the rat adrenal cortex. *J. Endocrinol.*, **139**, 301-306.
- Honour, J.W. and Shackleton, C.H.L. (1977). Mass spectrometric analysis for tetrahydroaldosterone. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 299-305.
- Houssay, B.A. and Di Benedetto, E. (1932). Papel de la hipófisis en las hiperglucemias adrenalínicas y morfínicas del sapo. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **8**, 448-453.
- Howell, B.J., Baumgardner, F.W., Bondi, K. and Rahn, H. (1970). Acid-base balance in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. *Am. J. Physiol.*, **218**, 600-606.
- Ishii-Ohba, H., Saiki, N., Inano, H. and Tamaoki, B.I. (1986a). Purification and characterization of rat adrenal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase with steroid 5-ene-4-ene-isomerase. *J. Steroid Biochem.*, **24**, 753-760.
- Ishii-Ohba, H., Inano, H. and Tamaoki, B.I. (1986b). Purification and properties of testicular 3β -Hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and 5-ene-4-ene isomerase. *J. Steroid Biochem.*, **25**, 555-560.
- Johnston, J.P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol.*, **17**, 1285-97.
- Johnston, C.I., Davis, J.O., Wright, F.S. and Howards, S.S. (1967). Effect of renin and ACTH on adrenal steroid secretion in the American bullfrog. *Am. J. Physiol.*, **213**, 393-399.
- Jungreis, A.M., Huibregtse, W.H. and Ungar, F. (1970). Corticosteroid identification and corticosterone concentration in serum of *Rana pipiens* during dehydration in winter and summer. *Comp. Biochem. Physiol.*, **34 A**, 683-689.
- Jungreis, A.M. and Johnston, J.W. (1979). Aldosterone levels in *Rana pipiens*: Hormone titers do not always reflect rates of synthesis or target tissue responsiveness. *Comp. Biochem. Physiol.*, **63 A**, 307-311.
- Kasai, R., Kitajima, Y., Martin, C.E., Nozawa, Y., Skriver, L. and Thompson Jr., G.A. (1976). Molecular control of membrane properties during temperature acclimation. Membrane fluidity regulation of fatty acid desaturase action. *Biochemistry*, **15**, 5228-5233.
- Kirk, D.N. and Rajagopalan, M.S. (1976). A synthesis of $11\beta,18,21$ -trihydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione (18-hydroxycorticosterone). *Chem. Commun.*, **2**, 77-78.

-
- Kliman, B. and Peterson, R.E. (1960). Double isotope derivative assay of aldosterone in biological extracts. *J. Biol. Chem.*, **235**, 1639-1648.
 - Kloas, W. and Hanke, W. (1992a). Atrial natriuretic factor (ANF) binding sites in frog kidney and adrenal. *Peptides*, **13**, 297-303.
 - Kloas, W. and Hanke, W. (1992b). Localization and quantification of atrial natriuretic factor binding sites in the kidney of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**, 26-35.
 - Kloas, W. and Hanke, W. (1992c). Localization and quantification of nonapeptide binding sites in the kidney of *Xenopus laevis*: Evidence for the existence of two different nonapeptide receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**, 71-78.
 - Kloas, W. and Hanke, W. (1992d). Effects of atrial natriuretic factor on corticosteroid and catecholamine secretion by the adrenals of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**, 269-277.
 - Knox, J.H. and Pryde, A. (1975). Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **112**, 171-188.
 - Kojima, I., Inano, H. and Tamaoki, B.I. (1982). The final step of aldosterone biosynthesis is catalyzed by an NADPH-dependent and molecular oxygen-requiring enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **106**, 617-624.
 - Kondo, E., Mitsugi, T. and Tori, K. (1965). Microbiological synthesis of aldosterone from corticosterone. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4655-4656.
 - Kraulis, I. and Birmingham, M.K. (1964). The conversion of 11 β -hydroxyprogesterone to corticosterone and other steroid fractions by rat and frog adrenal glands. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, **47**, 76-84.
 - Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Pelletier, G., Belanger, A., Lachance, Y., Zhao, H., Labrie, C., Breton, N., De Launoit, Y, Dumont, M., Dupont, E., Rheaume, E., Martel, C., Couet and Trudel, C. (1992). Structure and tissue-specific expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 421-435.
 - Lachance, Y., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Dumont, M., Launoit, Y., Guerin, S., Leblanc, G. and Labrie, F. (1990). Characterization of human 3 β -hydroxysteroid

dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20469-20475.

- Lai, J.C.K. and Clark, J.B. (1979). Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol.*, **55**, 51-60.
- Lantos, C.P., Birmingham, M.K. and Traicov, H. (1967). Effect of ACTH on the metabolism of radioactive C-21 steroids by quartered rat adrenals. *Acta Physiol. Lat. Am.*, **18**, 42-54.
- Lantos, C.P., Damasco, M.C., Aragonés, A., Ceballos, N.R., Burton, G. and Cozza, E.N. (1987). Versatile steroid molecules at the end of the aldosterone biosynthesis. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 791-800.
- Larcher, A., Delarue, C., Idres, S., Lefebvre, H., Feuilloley, M., Vandesande, F., Pelletier, G. and Vaudry, H. (1989). Identification of vasotocin-like immunoreactivity in chromaffin cells of the frog adrenal gland. Effect of vasotocin on corticosteroid secretion. *Endocrinology*, **125**, 2691-2700.
- Larcher, A., Lamacz, M., Delarue, C. and Vaudry, H. (1992a). Effect of vasotocin on cytosolic free calcium concentration in frog adrenocortical cells in primary culture. *Endocrinology*, **131**, 1087-1093.
- Larcher, A., Delarue, C., Homo-Delarche, F., Kikuyama, S., Kupryszewski, G. and Vaudry, H. (1992b). Pharmacological characterization of vasotocin stimulation of phosphoinositide turnover in frog adrenal gland. *Endocrinology*, **130**, 475-483.
- Larcher, A., Delarue, C., Idres, S. and Vaudry, H. (1992c). Interactions between vasotocin and other corticotropic factors on the frog adrenal gland. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 795-798.
- Lascano-Gonzalez, J.M. (1935). Infartos hipofisarios por lesiones tuberarias en el sapo. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **11**, 309-313.
- Leboulanger, F., Perroteau, I., Netchitailo, P., Lihmann, I., Leroux, P., Delarue, C., Coy, D.H. and Vaudry, H. (1984). Action of vasoactive intestinal peptide (VIP) on amphibian adrenocortical function, *in vitro*. *Peptides*, **4**, 299-303.
- Leboulanger, F., Delarue, C., Jegou, S., Netchitailo, P., Leroux, P., Tonon, M.C. and Vaudry, H. (1980). *In vitro* study of frog (*Rana ridibunda* Pallas) interrenal function by use of a simplified perfusion system. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **42**, 389-400.

-
- Leboulenger, F., Delarue, C., Tonon, M.C., Jegou, S. and Vaudry, H. (1978). *In vitro* study of frog (*Rana ridibunda* Pallas) interrenal function by the use of a simplified perfusion system. I. Influence of adrenocorticotropin upon corticosterone release. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **36**, 327-338.
 - Leboulenger, F., Vaglini, L., Conlon, J.M., Homo-Delarche, F., Wang, Y., Kerdelhue, B., Pelletier, G. and Vaudry, H. (1993). Immunohistochemical distribution, biochemical characterization, and biological action of tachykinins in the frog adrenal gland. *Endocrinology*, **133**, 1999-2008.
 - Leroux, P., Delarue, C., Leboulenger, F., Jegou, S., Tonon, M.C., Vaillant, R., Corvol, P. and Vaudry, H. (1980). Development and characterization of radioimmunoassay technique for aldosterone. Application to the study of aldosterone output from perfused frog interrenal tissue. *J. Steroid Biochem.*, **12**, 473-478.
 - Lillywhite, H.B. (1970). Behavioral temperature regulation in the bullfrog *Rana catesbiana*. *Copeia*, **1**, 158-168.
 - Lillywhite, H.B. and Licht, P. (1975). A comparative study of integumentary mucous secretions in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51 A**, 937-941.
 - Lorence, M.C., Murry, B.A., Trant, J.M. and Mason, J.I. (1990). Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 /isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology*, **126**, 2493-2498.
 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - Lupo di Prisco, C., Bellini-Cardellini, L., Polzonetti-Magni, A. e Lucarini, N. (1971). La formazione di corticosteroids nel surrene di *Rana esculenta* durante il ciclo sessuale. *Boll. Zool.*, **38**, 537.
 - Lupo di Prisco, C., Bellini-Cardellini, L. and Polzonetti-Magni, A. (1974). Effetto della somministrazione di ipofisi sulla steroidogenesi nel surrene di *Rana esculenta*. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **50**, 1125-1131.
 - Lupo di Prisco, C., Lucarini, N., Bellini-Cardellini, L. and Polzonetti-Magni, A (1976). The effects of ovariectomy and hypophysectomy on corticosteroidogenesis by the adrenals of *Rana esculenta*. *Biochem. Exp. Biol.*, **12**, 85-90.

-
- Luu-The, V., Takahashi, M. and Labrie, F. (1991). Differential inhibition of dehydrogenase and 5-ene-4-ene isomerase activities of purified 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Evidence for two distinct sites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **40**, 545-548.
 - Macchi, I.A. (1955). *In vitro* ACTH stimulation of incubated frog adrenals. *Biol. Bull.*, **109**, 373-374.
 - Macchi, I.A. and Phillips, J.G. (1966). *In vitro* effect of adrenocorticotropin on corticoid secretion in the turtle, snake, and bullfrog. *Gen Comp. Endocrinol.*, **6**, 170-182.
 - Maggio, B. (1994). The surface behavior of glycosphingolipids in biomembranes: a new frontier of molecular ecology. *Progress Biophys. Molec. Biol.*, **62**, 55-117.
 - Malan, A., Wilson, T. and Reeves, R.B. (1976). Intracellular pH in cold-blooded vertebrates as a function of temperature. *Respir. Physiol.*, **28**, 29-47.
 - Maser, C., Janssens, P.A. and Hanke, W. (1981). Stimulation of interrenal secretion in Amphibia. I: Direct effects of electrolyte concentration on steroid release. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**, 458-466.
 - Mehdi, A.Z. and Carballeira, A. (1971a). Steroid biosynthesis in the American bullfrog (*Rana catesbiana*) interrenals. I. *In vitro* studies with progesterone-4-¹⁴C. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 1-13.
 - Mehdi, A.Z. and Carballeira, A. (1971b). Steroid biosynthesis by the American bullfrog (*Rana catesbiana*) interrenals. II. *In vitro* studies with cholesterol-4-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 14-21.
 - Morra, M., Leboulenger, F. and Vaudry, H. (1990). Dopamine inhibits corticosteroid secretion from frog adrenal gland. *Endocrinology*, **127**, 218-226.
 - Morra, M., Leboulenger, F., Desrues, L., Tonon, M.C. and Vaudry, H. (1991). Dopamine inhibits inositol phosphate production, arachidonic acid formation, and corticosteroid release by frog adrenal gland through a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Endocrinology*, **128**, 2625-2632.
 - Morris, D.J. (1981). The metabolism and mechanism of action of aldosterone. *Endocr. Rev.* **2**, 234-247.
 - Müller, J. (1971). Regulation of aldosterone biosynthesis. *Monogr Endocrinol.*, **5**, 1-137.
 - Müller, J. (1988). Regulation of aldosterone production. Berlin, Heidelberg. Springer Verlag. 1-

365.

- Munson, P., Rodbard, D. and Jaffe, M.L. (1989). IBM PC. Copyright (C), NHI Bethesda M.D., USA, 20014.
- Netchitailo, P., Lihmann, I. and Vaudry, H. (1984). Lack of effect of dexamethasone on corticosteroid production in the amphibian. *J. Steroid Biochem.*, **21**, 727-731.
- Netchitailo, P., Perroteau, I., Feuilloley, M., Pelletier, G. and Vaudry, H. (1985). *In vitro* effect of cytochalasin B on adrenal steroidogenesis in frog. *Molec. Cell. Endocrinol.*, **43**, 205-213.
- Netchitailo, P., Lihmann, I., Perroteau, I., Delarue, C., Leboulenger, F. and Vaudry, H. (1986). Involvement of cycloheximide-sensitive mediators in the steroidogenic action of adrenocorticotropin and angiotensin II. *J. Steroid Biochem.*, **25**, 59-64.
- Neher, R. (1963). Chromatographic mobilities. In: "Physical Properties of the Steroid Hormones" (Engel, ed.). p.58. Pergamon, Oxford.
- Nicolis, G.L. and Ulick, S. (1965). Role of 18-hydroxylation in the biosynthesis of aldosterone. *Endocrinology*, **76**, 514-521.
- Nielsen, J.B.K., Plant, P.W. and Haschemeyer, A.E.V. (1977). Control of protein synthesis in temperature acclimation: II. Correlation of elongation factor 1 activity with elongation rate *in vivo*. *Physiol. Zool.*, **50**, 22-30.
- Palacios, G. and Lafraga, M. (1975). Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.*, **164**, 275-278.
- Pedemera, E.A. and Lantos, C.P. (1973). The biosynthesis of adrenal steroids by the 15-day-old chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **20**, 331-341.
- Pennington, R.J. (1961). Biochemistry of dystrophic muscle: Mitochondrial succinate-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase. *Biochem. J.*, **80**, 649-654.
- Peron, F.G. and McCarthy, J.L. (1968). Corticoidogenesis in rat adrenal, In: "Functions of the adrenal cortex". Vol.I, (McKerns, K.W., ed.). Appl. Century-Crofts, New York. pp. 261-338.
- Perroteau, I., Netchitailo, P., Homo-Delarche, F., Delarue, C., Lihmann, I., Leboulenger, F. and Vaudry, H. (1984). Role of exogenous and endogenous prostaglandins in steroidogenesis by isolated frog interrenal gland: Evidence for a dissociation in ACTH and angiotensin action. *Endocrinology*, **115**, 1765-1773.

-
- Perry, J., Ishii-Ohba, H. and Stalvey, J.R. (1991). Subcellular distribution of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase in bovine and murine adrenocortical tissue: Species differences in the localization of activity and immunoreactivity. *Steroids*, **56**, 329-336.
 - Pesonen, S. and Rapola, J. (1962). Observations on the metabolism of adrenal and gonadal steroids in *Xenopus laevis* and *Bufo bufo*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 425-432.
 - Phillips, J.G. and Chester-Jones, I. (1957). The identity of adrenocortical secretions of lower vertebrates. *J. Endocrinol.* **16**, iii.
 - Piezzi, R.S. and Burgos, M.H. (1968). The toad adrenal gland. I. Cortical cells during summer and winter. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **10**, 344-354.
 - Piper, G.D. and de Roos, R. (1967). Evidence for a corticoid-pituitary negative feedback mechanism in the American bullfrog (*Rana catesbiana*). *Gen Comp. Endocrinol.*, **8**, 135-142.
 - Psychoyos, S., Tallan, H.H. and Greengard, P. (1966). Aldosterone synthesis by adrenal mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2949-2956.
 - Raman, P.B., Sharma, D.C. and Dorfman, R. (1966). Studies on aldosterone biosynthesis *in vitro*. *Biochemistry*, **4**, 1376-1385.
 - Reeves, R.B. (1972). An imidazole alphasat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Respir. Physiol.*, **14**, 219-236.
 - Reeves, R.B. (1976). Temperature-induced changes in blood acid-base status: pH and PCO₂ in a binary buffer. *J. Appl. Physiol.*, **40**, 762-767.
 - Reeves, R.B. (1977). The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.*, **39**, 559-586.
 - Rheaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., de Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J. and Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in human adrenals and gonads. *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1147-1157.
 - Reinning, L.N., Daugherty, C.H. and Daugherty, L.B. (1980). Plasma aldosterone concentrations in wild and captive western spotted frogs (*Rana pretiosa*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **65 A**, 517-518.
 - Schnaitman, C., Erwin, V.G. and Greenawalt, J.W. (1967). The submitochondrial

localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol.*, **32**, 719-35.

- Schnaitman, C., Greenawalt, J.W. (1968). Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol*, **38**, 158-75.
- Samuels, L.T., Helmreich, M.L., Lasuter, M.B. and Reinch, H. (1951). An enzyme in endocrine tissue which oxidizes delta 5-3 hydroxy steroids to α , β unsaturated ketones. *Science*, **113**, 490-491.
- Sander, M., Ganten, D. and Mellon, S. (1994). Role of renin in the regulation of adrenal steroidogenesis by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 148-152.
- Sandor, T. (1969). A comparative survey of steroids and steroidogenic pathways throughout the vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2**, 281-298.
- Satre, M., Vignais, P.V. and Idelman, S. (1969). Distribution of the steroid 11 β -hydroxylase and the cytochrome P-450 in membranes of beef adrenal cortex. *FEBS Lett.*, **5**, 135-140.
- Shacklee, J.B., Christiansen, J.A., Siddel, B.D., Prosser, C.L. and Whitt G.S. (1977). Molecular aspects of temperature acclimation in fish: contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. *J. Exp. Zool.*, **201**, 1-20.
- Shackleton, C.H. (1986). Profiling steroid hormones and urinary steroids. *J. Chromatogr.*, **379**, 91-156.
- Sibley, C.P., Whitehouse, B.J., Vinson, G.P. and Goddard, C. (1978). Studies on the distribution of steroid between medium and tissue after incubation of rat adrenal glands in vitro. *J. Endocrinol.*, **79**, 63-64.
- Simard, J., Couet, J., Durocher, F., Labrie, Y., Sanchez, R., Breton, N., Turgeon, C. and Labrie, F. (1993). Structure and tissue-specific expression of a novel member of the rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD) family. The exclusive 3 β -HSD gene expression in the skin. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19659-19668.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 522-525.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F. (1969). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, p. 299-342 y 607. Freeman, San Francisco.

- Sullivan, L.P. (1974). Physiology of the kidney. Pp.149-163. Lea & Febiger. Pennsylvania.
- Takahashi, M., Luu-The, V. and Labrie, F. (1990). Inhibitory effect of synthetic progestins, 4MA and cyanoketone on human placental 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5:4-ene-isomerase activity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **37**, 231-236.
- Tallan, H.H., Psychoyos, S. and Greengard, P. (1967). Aldosterone synthesis by adrenal mitochondria. II. The effect of citric acid cycle intermediates, identification of the soluble stimulatory factor as fumarate. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1912-1914.
- Taylor, A.A., Davis, J.O. and Braverman, B. (1972). Deoxycorticosterone secretion in the bullfrog: effects of ACTH, hypophysectomy, and renin. *Am. J. Physiol.*, **223**, 858-863.
- Thomas, J., Ebenezer, A., Berko, E., Faustino, A., Myers, R. and Strickler, R. (1988). Human placental 3β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5:4-ene-isomerase: Purification from microsomes, substrate kinetics, and inhibition by product steroids. *J. Steroid Biochem.*, **31**, 785-793.
- Thomas, J., Myers, R. and Strickler, R. (1989). Human placental 3β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5-4-ene-isomerase: Purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzyme. *J. Steroid Biochem.*, **33**, 209-217.
- Thomas, J., Myers, R., Rosik, L. and Strickler, R. (1990). Affinity alkylation of human placental 3β hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5-4-ene-isomerase by 2α -bromoacetoxy-progesterone: Evidence for separate dehydrogenase and isomerase sites on one protein. *J. Steroid Biochem.*, **36**, 117-123.
- Thompson, A.J., Sargent, J.R. and Owen, J.M. (1977). Influence of acclimatization temperature and salinity on Na-K-dependent adenosine triphosphatase and fatty acid composition in the gills of the eel (*Anguila anguila*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **56 B**, 223-228.
- Tremblay, André and Lehoux, J.G. (1992). Influence of captopril in adrenal cytochrome P-450s and adrenodoxin expression in high potassium or low sodium intake. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 799-808.
- Tsugawa, K. (1976). Direct adaptation of cells to temperature: Similar changes of LDH isozyme patterns *in vivo* and *in situ* adaptations in *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55 B**, 259-263.

- Tsugawa, K. (1980). Thermal dependence in kinetic properties of lactate dehydrogenase from the African clawed toad, *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67 B**, 289-295.
- Tsukuda, H. (1975). Temperature dependence of the relative activities of the liver lactate dehydrogenase isozymes in goldfish acclimated to different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52 B**, 343-345.
- Ulick, S. and Feinholtz, E. (1968). Metabolism and rate of secretion of aldosterone in the bullfrog. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2523-2529.
- Ulick, S. and Kusch, K. (1960). A new C-18 oxygenated corticosteroid from bullfrog adrenals. *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 6421-6422.
- Ulick, S., Nicolis, G.L. and Kusch, K. (1964). Relationship of 18-hydroxycorticosterone to aldosterone. Symposium on aldosterone. Prague. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 3-17.
- Varma, M.M. (1977). Ultrastructural evidence for aldosterone and corticosterone-secreting cells in the adrenocortical tissue of the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **33**, 61-75.
- Vecsei, P., Lommer, D. and Wolff, H.P. (1968). The intermediate role of 18-hydroxycorticosteroids in aldosterone biosynthesis. *Experientia*, **24**, 1199-1201.
- Vic, S.B. and Capaldi, R.A. (1977). Lipid requirements for cytochrome c oxidase activity. *Biochemistry*, **16**, 5755-5729.
- White, F.N. and Somero, G. (1982). Acid-base regulation and phospholipid adaptation to temperature: Time courses and physiological significance of modifying the milieu for protein function. *Physiol. Rev.*, **62**, 40-90.
- Wikby, A., Thalen, A. and Oresten, G. (1978). Separations of epimers of budesonide and related corticosteroids by high-performance liquid chromatography. A comparison between straight and reverse-phase systems. *J. Chromatogr.*, **157**, 65-74.
- Wilkinson GN (1961). Statistical Estimations in Enzyme Kinetics *Biochem. J.*, **80**, 324-332.
- Wilson, J.X. (1984). The renin-angiotensin system in nonmammalian vertebrates. *Endocr. Rev.*, **5**, 45-61.
- Wilson, T. (1977). Interrelations between pH and temperature for the catalytic rate of the M₄ isozyme of lactate dehydrogenase from goldfish (*Carassius auratus*). *Arch. Biochem.*

Biophys., **182**, 409-419.

- Wodtke, E. (1976). Discontinuities in the Arrhenius plots of mitochondrial membrane-bound enzyme systems from a poikilotherm: acclimation temperature of carp affects transition temperatures. *J. Comp. Physiol.*, **110**, 145-157.
- Yabu, M., Senda, T., Nonaka, Y., Matsukawa, N., Okamoto, M. and Fujita, H. (1991). Localization of the gene transcripts of 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase in the adrenal cortex by *in situ* hybridization. *Histochemistry*, **96**, 391-394.
- Yagci, A. and Müller, J. (1996). Induction of steroidogenic enzymes by potassium in cultured rat zona glomerulosa cells depends on calcium influx and intact protein synthesis.
- Yancey, P.H. and Somero, G.N. (1978). Temperature dependence of intracellular pH; its role in the conservation of pyruvate apparent K_m values of vertebrate lactate dehydrogenases. *J. Comp. Physiol.* **125**, 129-134.
- Yates, J. and Deshpande, N. (1975). Evidence for the existence of a single 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 -3-oxosteroid isomerase complex in the human adrenal gland. *J. Endocrinol.*, **64**, 195-196.
- Yon, L., Feuilleley, M., Chartrel, N., Arimura, A., Fournier, A. and Vaudry, H. (1993). Localization, characterization and activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the frog adrenal gland. *J. Endocrinol.*, **139**, 183-194.
- Zaffaroni, A. and Burton, R.B. (1951). Identification of corticosteroids of beef adrenal extract by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, **193**, 749-767.

