Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis de Posgrado

Regulación de la esteroidogénesis Adrenal: Efectos de endotelina y ACTH, y Rol de la 11beta-Hidroxiesteroide Deshidrogebnasa

Romero, Damián Gastón

1999

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

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

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

Cita tipo APA:
Romero, Damián Gastón. (1999). Regulación de la esteroidogénesis Adrenal: Efectos de endotelina y ACTH, y Rol de la 11beta-Hidroxiesteroide Deshidrogebnasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3228_Romero.pdf

Cita tipo Chicago:
Romero, Damián Gastón. "Regulación de la esteroidogénesis Adrenal: Efectos de endotelina y ACTH, y Rol de la 11beta-Hidroxiesteroide Deshidrogebnasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3228_Romero.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Regulación de la Esteroidogénesis Adrenal: Efectos de Endotelina y ACTH, y Rol de la 11β-Hidroxiesteroide Deshidrogenasa.

Autor: Lic. Damián Gastón Romero

Director: Dr. Eduardo Néstor Cozza

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y PRHOM (CONICET).

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

-1999-

2298

Nº 122.834

Resumen

Este trabajo pretende dilucidar algunos de los mecanismos regulatorios de la esteroidogénesis adrenal por Endotelina (ET) y Adrenocorticotrofina (ACTH) y el rol de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD). Con este fin se obtuvieron los siguientes aportes:

Adrenales de ratas infundidas con ET presentan, además del efecto corticoidogénico ya conocido, a) un incremento de la captación del sustrato primario para la esteroidogénesis, colesterol, *in vitro*; este incremento es mediado por los receptores ET_B. b) un incremento en la actividad del citocromo $P\text{-}450_{scc}$, mediado por los receptores ET_A. La actividad de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa no se modifica por ET.

La glándula adrenal de rata y vaca expresa actividad de las isoformas 1 y 2 de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD). Ambas isoformas presentan características bioquímicas y cinéticas similares a las halladas en otros órganos de rata y en otras especies.

En ratas, el tratamiento agudo con ACTH *in vivo* produce una disminución de la actividad adrenal de esta enzima, mientras que el tratamiento crónico (48 hs) causa un aumento de la misma. Este último incremento es mediado por un aumento en los niveles proteicos de la 11β-HSD-2 aunque no se modifican los niveles de su mRNA. Se propone un modelo de regulación de la esteroidogénesis adrenal por la actividad de la 11β-HSD.

El tratamiento agudo con ACTH de células dispersas de fasciculata adrenal de rata produce una disminución de la actividad de 11β-HSD determinada en células enteras o en sus microsomas. Esta regulación sería mediada por la vía de cAMP-PKA ya que es revertida por inhibidores de esta kinasa y simulada por db-cAMP. Además, la presencia de fosforilaciones/desfosforilaciones se comprueba con experimentos con fosfatasa alcalina.

Se realizó el clonado, expresión y caracterización de la 11β-HSD-2 bovina. Se estudiaron las características bioquímicas y cinéticas de la proteína expresada en células CHOP. La comparación estructural, cinética y funcional de la 11β-HSD-2 bovina demuestra estrecha similitud con su contraparte de rata y humana.

Palabras clave: adrenal, esteroidogénesis, endotelina, ACTH, 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Adrenal Steroidogenesis Regulation: Effects of Endothelin and ACTH, and Role of 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase.

Abstract

This work is focused on elucidation of some of the regulatory mechanisms of endothelin (ET)- or adrenocorticotrophic hormone (ACTH)- mediated adrenal steroidogenesis and the role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-HSD). To this propouse the following contributions were obtained:

Adrenal glands from ET-infused rat shows, besides the well-known corticosteroidogenic effect, a) increase of cholesterol uptake (cholesterol is the primary substrate for steroidogenesis); this increment is mediated through ET_B receptors. b) Increment of cytochrome $P\text{-}450_{scc}$ activity, which is mediated by ET_A receptors. ET does not modify 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity.

Rat and bovine adrenal gland expresses isoforms 1 and 2 of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-HSD) activity. Both isoforms present biochemical and kinetic characteristics similar to that reported for other rat organs and animal species.

Treatment of rats with ACTH (acute experiment) produces a decrease in adrenal activity of this enzyme, while chronic treatment (48 hs) causes an increase. This last increment is mediated by an increase in 11β-HSD-2 protein levels although 11β-HSD-2 mRNA levels were not modified. A model for regulation of steroidogenesis by 11β-HSD is proposed.

Acute ACTH treatment of dispersed rat fasciculata adrenal cells causes a decrease in 11β-HSD activity measured in whole cells or in their microsomes. The cAMP-PKA pathway mediates this regulation as it is reverted by inhibitors of this kinase and mimicked by db-cAMP. Also, the existence of phosphorylation/dephosphorylation process is proved by experiments with alkaline phosphatase.

Cloning, expression and characterization of bovine 11β-HSD-2 were carried out. Biochemical and kinetic properties of this enzyme were studied in CHOP cells expressing bovine 11β-HSD-2. Structural, kinetic and functional comparisons of bovine 11β-HSD-2 show a high degree of similarity with its rat and human counterparts.

Keywords: adrenal, steroidogenesis, endothelin, ACTH, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase

a Agustín Matías

Deseo expresar mi agradecimiento,

al Dr. Eduardo N. Cozza por haberme guiado, enseñado y estimulado como mi Director. Por haberme permitido trabajar con absoluta libertad, por permitirme crecer como científico y persona. Por la confianza depositada. Porque fue un gusto ser su becario. Porque a pesar de los encuentros y desencuentros, lo volvería a elegir.

al Dr. Carlos P. Lantos por permitirme trabajar en su laboratorio y formar parte de su grupo de trabajo. Porque no hay que coincidir en todo con un alguien para decir que es una gran persona.

al Dr. Celso E. Gomez-Sanchez por abrirme las puertas de su laboratorio de la University of Missouri-Columbia donde realicé parte del trabajo presentado. En realidad, le agradezco por abrirme las puertas de par en par, por poner todo su laboratorio a mi disposición, por permitirme trabajar con absoluta libertad. Por enseñarme que significa hacer ciencia, por seducirme continuamente hacia el apasionante mundo de la investigación. Por otro lado, con no menor importancia, porque junto con Elise y sus hijos me abrió las puertas de su casa. Por toda la confianza depositada en mi. En fin, por permitirme realizar mi primer clonado, por aceptarme como uno más de su familia.

a mis compañeros de laboratorio Adali y Laura. A Adali por haberme incorporado al laboratorio y haberme guiado en mis primeros pasos con la endotelina; por sus interminables consejos; por su apoyo constante. A Laura por todos los momentos compartidos a lo largo de estos años y por soportar estoicamente el desorden generado por mi.

a todos mis compañeros de laboratorio: Guillermo, Mario, Nora, Andrea, Fabián, Cristina, Pilar y Marisa. A Guillermo por sus consejos invalorables, por su estímulo, por estimularme a ir al exterior, por los momentos compartidos. A Andrea por su compañerismo. A Nora por la ayuda brindada, por ser la hermana mayor de todos. A Fabián por sus consejos, por las charlas compartidas cuando se ve la meta y parece que nunca se va a llegar.

a Norma, Rubén y Felisa por su ayuda y colaboración.

a Beba por la asistencia técnica y por todo lo que me enseñó.

a mis compañeros del pasillo: Gabriela, María, Claudia, Silvia, María del Carmen, Alejandro, Marina, Adriana.

a las chicas de Biología Molecular, muy especialmente a Silvia R., Vanina, Elba, Silvia M., Cecilia y Eduardo (la excepción que confirma la regla) por su invalorable ayuda y estímulo.

a mis compañeros en Columbia sin cuya invalorable y desinteresada colaboración hubiese sido imposible realizar mi trabajo, y muy especialmente por su calidez humana. A Ming Yi por haberme introducido en el mundo de la Biología Molecular y guiado constantemente, por haberme enseñado todo sin guardarse nada. A Marck por ser el compañero de laboratorio que cualquiera querría tener, por todos los momentos compartidos, por su ayuda incondicional. A Suzy por toda la ayuda e interminables consejos brindados.

a la Dra. Rosa Lederkremer por permitirme el uso del contador de centelleo líquido y muy especialmente a toda la gente que trabaja en su laboratorio sin cuyas extenuantes caminatas hasta el contador todo hubiera sido todavía más difícil.

a la Dra. Selva Cigorraga por la cianocetona.

al Dr. Enrique Isola de Ciba Geigy por la aminoglutetimida.

a toda esa gente que recuerdo ahora, aunque de algunos siempre me acordaré en un rato, que con consejos, ayuda o material colaboraron y que sin ellos esto hubiera sido un cuento de nunca acabar: lab. Dra. Carmen Sanchez-Rivas, lab. Biología Celular, lab. de María del Carmen Ríos, lab. Inmunoquímica, lab. de Juan C. Calvo, lab. Dr. Arturo Vitale.

al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

a la Universidad de Buenos Aires por las becas otorgadas que permitieron la subsistencia.

a la Universidad de Buenos Aires, CONICET y Fundación Antorchas por el apoyo financiero brindado para la realización de este trabajo experimental.

ÍNDICE

Introducción *1*

La glándula adrenal **2**

Generalidades 2

La corteza adrenal 3

Biosíntesis de esteroides **4**

Generalidades 4

Fuentes de colesterol para la síntesis de esteroides adrenales 5

Caminos biosintéticos 6

Inhibidores de la esteroidogénesis 10

Regulación de la secreción de gluco y mineralocorticoides **11**

Regulación de la secreción de glucocorticoides 11

Estructura y síntesis del POMC 11

Acciones del ACTH en la corteza adrenal 12

Regulación de la secreción de mineralocorticoides 13

Endotelina **15**

Producción de Endotelina 16

Receptores de Endotelina y sistema de señales intracelulares 18

Acciones de Endotelina 19

Sistema cardiovascular 19

Otros tejidos 20

Sistema endócrino 21

Agonistas y antagonistas 24

11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa **26**

Generalidades 27

Características de la 11β-HSD-1 27

Características de la 11β-HSD-2 30

Bioquímica del metabolismo del cortisol 32

Funciones del receptor de mineralocorticoides 34

Acciones de la aldosterona 34

Estructura y función del receptor de mineralocorticoides 35

Hipótesis: La 11β-HSD-2 proteje al receptor de mineralocorticoides 36

Pérdida de función de la 11β-HSD 39

Síndrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides 39
Características clínicas 39
Hallazgos bioquímicos 40
Bases moleculares 41
Tratamiento 42
Intoxicación con regaliz 43
Síndrome de ACTH ectópico 44
Inhibidores endógenos de la 11β-HSD 45
Roles de la 11β-HSD 47
Hígado 47
Riñón 47
Otros tejidos blanco de los mineralocorticoides: colon, glándula salival y piel. 49
Tejidos fetoplacentarios 49
Sistema cardiovascular 52
Gónadas 52
Sistema Nerviso Central 53
Otros tejidos 54

Objetivos 55

Materiales y Métodos 57

Materiales 58

Animales y tratamientos *in vivo* 59
Animales 59
Infusiones 59
Tratamientos crónicos con ACTH 60

Obtención de las glándulas adrenales y su fraccionamiento 60

Preparación de células dispersas 61

Incorporación de [^{3}H]-colesterol 62
Incorporación de [^{3}H]-colesterol *ex vivo* 62
Incorporación de [^{3}H]-colesterol *in vitro* 62
Suero enriquecido con [^{3}H]-colesterol 63

Actividad de las primeras enzimas del metabolismo del colesterol 63
Actividad del citocromo P-450$_{scc}$ 63
Validación del método de determinación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ 64
Validación de la partición con heptano y etanol:agua (8:2) 64
Actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ5 isomerasa 66

Determinación de aldosterona, corticosterona y 11-dehidrocorticosterona 67
Preparación de las muestras. 67
Radioinmunoensayo (RIA) 67

11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 69
Obtención de homogenatos y fraccionamiento subcelular 69
Determinación de la actividad enzimática 11β–HSD 70
Tratamiento con fosfatasa alcalina-Actividad de 11β-HSD 72
Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina 72
Tratamiento con PKA-Actividad de 11β-HSD 72
Determinación de la actividad de PKA 73
Fosforilación in vitro con PKA -Inmunoprecipitación 73
Marcación por fotoafinidad de la 11β-HSD-2 75
Fluorografía 75
Incubaciones con células dispersas 75

Extracción de RNA total y mRNA 77

Northern-blot 11β-HSD-2 77
Obtención de las sondas 78

Electroforesis en geles de poliacrilamida/Western-blot 11β-HSD-2 78
Puesta a punto de la técnica de Western-blot de 11β-HSD-2 80

Clonado y expresión de la 11β-HSD-2 bovina 82
Clonado de la 11β-HSD-2 bovina 82
Construcción del plásmido de expresión 84
Transfección transitoria y análisis enzimático 84

Distribución tisular de la 11β-HSD-2 bovina 86

Centelleo líquido 86

Determinación de proteínas 86

Análisis computacional 86

Análisis estadístico 87

Resultados y Discusión *89*

Sección 1: Efecto de Endotelina en la captación y metabolismo del colesterol. 90
Biosíntesis de aldosterona 92
Incorporación de [^{3}H]-colesterol *ex vivo* 94

Incorporación de [^{3}H]-colesterol *in vitro*: Suspensiones celulares. 97
Actividad del citocromo P-450$_{scc}$ 98
Subpoblaciones de receptores involucradas 101
Actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ5 isomerasa 102

Discusión 102

Sección 2: Caracterización bioquímica de la 11β–HSD de adrenal de rata 113
Actividad de 11β–HSD 113
Estudios de reversibilidad. Efecto del pH 117
Parámetros cinéticos 119
Inhibición por producto 120
Estudios de inhibicion de la actividad de 11β–HSD. 121
Distribución subcelular 122
Discusión 123

Sección 3: Regulación de la 11β–HSD adrenal por ACTH – En busca de un posible rol fisiológico. 130
Efecto agudo de ACTH *in vivo* 130
Validación de la medición de corticosterona intraadrenal 132
Efecto crónico de ACTH *in vivo* 133
Efecto agudo de ACTH en células de fasciculata adrenal *in vitro* 136
Efecto agudo de ACTH en células de fasciculata adrenal in vitro: Parámetros cinéticos 137
Efecto de ACTH en células enteras 137
Justificación del uso de cianocetona: Inhibición de la producción de corticosterona 139
Justificación del uso de cianocetona 10 μM: Inhibición de la actividad de 11β-HSD 141
Direccionalidad de la reacción de 11β–HSD 143
Curva dosis-respuesta de ACTH 143
Efecto de los fragmentos de ACTH$_{1-24}$: ACTH$_{1-10}$ y ACTH$_{11-24}$ 145
Efecto de inhibidores de la 11β-HSD en células de fasciculata 145
Discusión 147

Sección 4: Mecanismo de acción de ACTH agudo sobre 11β–HSD en células de fasciculata. 155
Efecto de Inibidores de Kinasas 156
Efecto de Staurosporina 157
Efecto de H-89 159
Efecto de Bisindolilmaleimida I 161
Efecto de diversos compuestos sobre la actividad de 11β–HSD microsomal 161
Efecto de db-cAMP 164

Efecto de fostatasa alcalina sobre la actividad de 11β–HSD-2 165
Efecto de la actividad de PKA *in vitro* sobre la actividad de 11β–HSD 167
Fosforilacion *in vitro* de la 11β-HSD-2 con [γ-^{32}P]-ATP 169
Discusión 171

Sección 5: 11β–HSD bovina: 11β–HSD-2 en adrenal bovina. Clonado y expresión de la 11β–HSD-2 178

Actividad 11β–HSD en adrenal bovina 178
Actividad de la 11β-HSD de adrenal bovina por corticosterona y cortisol. Comparación con rata. 180
Estudios de inhibición de la 11β-HSD-2 de vaca y rata por corticosterona, cortisol y sus derivados 11-oxidados. 181
Marcado por fotoafinidad de la 11β-HSD-2. 182
Clonado, expresión y caracterización de 11β–HSD-2 bovina 184
Estrategia de clonado y aislamiento del cDNA de la 11β–HSD-2 bovina 184
Actividad de 11β-HSD-2 bovina en células transfectadas enteras 188
Actividad de 11β-HSD-2 bovina en homogenatos de células transfectadas 189
Características del cDNA 191
Caracterización de la 11β–HSD-2 bovina: Células enteras 191
Caracterización de la 11β–HSD-2 bovina: Homogenatos 198
Distribución tisular 201
Discusión 202

A modo de conclusión 217

Bibliografía 223

Abreviaturas 269

INTRODUCCIÓN

La glándula adrenal

Generalidades

La anatomía de la glándula adrenal fue descripta por primera vez en 1563 por Bartholomeo Eustachius en su tratado *Tabulae Anatomicae* [1,2 y sus citas]. Posteriormente diversos autores describieron las regiones cortical y medular de esta glándula, y la formación de la adrenal fetal. En 1866, finalmente, J. Arnold definió las tres zonas de la corteza con los nombres utilizados actualmente, a saber las zonas glomerulosa, fasciculata y reticularis. Las glándulas adrenales son esenciales para la vida, hecho observado mediante experimentos de adrenalectomía en diversas especies; en todos los casos se observó que la operación llevó a un desenlace fatal luego de varios días aunque este efecto podía ser revertido mediante la administración contínua de extractos lipídicos de adrenales de animales normales [1,2 y sus citas].

Los mamíferos poseen dos glándulas adrenales localizadas en la parte superior de cada riñón. Cada glándula consiste en su interior, tanto anatómica como funcionalmente, de dos glándulas endócrinas. La porción exterior, o corteza adrenal, está compuesta principalmente por células adrenocorticales productoras de esteroides con depósitos lipídicos que recubren a una masa interna de células cromafines denominada la médula adrenal.

Las células adrenocorticales derivan del epitelio celómico en la región pronefrónica del embrión adyacente a la región genital que dará origen a las gónadas. Estas células producen glucocorticoides, mineralocorticoides, y andrógenos débiles como la dehidroepiandrosterona (DHEA). La secreción de los glucocorticoides y probablemente de DHEA está bajo la influencia estimulatoria directa de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, "Adrenocorticotropic Hormone") secretada por la hipófisis. La secreción de los mineralocorticoides está regulada principalmente por el sistema renina-angiostensina aunque las células de la zona glomerulosa poseen mayor número de receptores a ACTH que las células de la zona fasciculata. Los glucocorticodes son denominados así por su influencia en el metabolismo de la glucosa y los mineralocorticoies por sus efectos en el balance de Na^+ y K^+. Los principales glucocorticoides en los mamíferos son el cortisol, la corticosterona y el

11-desoxicortisol. Los principales mineralocorticoides son la aldosterona y la 11-desoxicorticosterona.

La corteza adrenal

La corteza adrenal de los mamíferos adultos puede ser subdividida en base a criterios histológicos en tres zonas: la zona glomerulosa, la zona fasciculata y la zona reticularis (Fig 1.1) [1,3,4]. Estas regiones se ubican como capas concéntricas rodeando a la médula adrenal.

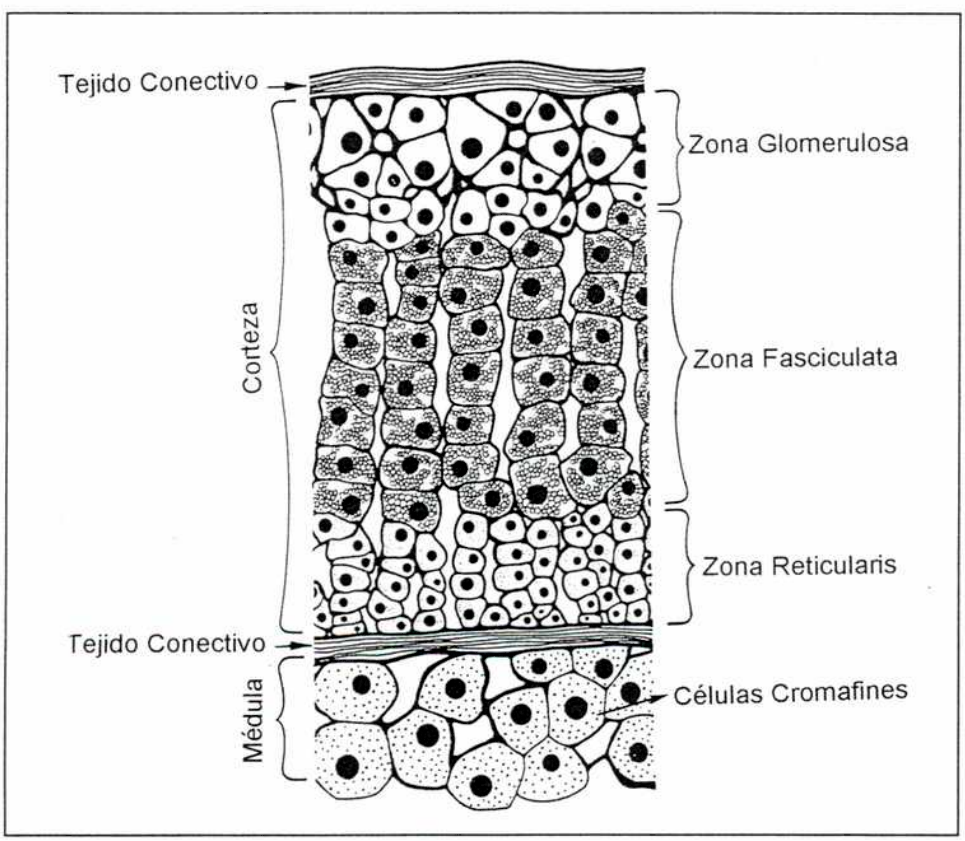


Fig. 1.1. Esquema de la zonación de la glándula adrenal.
Reproducido de [3].

Las células de la región más externa de la corteza adrenal, la zona glomerulosa, son pequeñas, más redondeadas y contienen menos lípidos que aquéllas de la región más central: la zona fasciculata. La zona glomerulosa es la responsable de la síntesis de aldosterona. Existen pocos cambios citológicos en la zona glomerulosa luego de la hipofisectomía o la administración de ACTH, sugiriendo que la secreción de aldosterona

es independiente del control de la hipófisis. Aunque ACTH no es necesario para la esteroidogénesis y liberación de aldosterona, la respuesta de las células de la zona glomerulosa a agentes que normalmente producen estas respuestas se halla reducida en animales hipofisectomizados y se incrementa con tratamientos con ACTH.

La zona fasciculata está localizada entre la zona glomerulosa y la zona reticularis y es histológicamente distinta de ambas. Las células de la zona fasciculata están dispuestas en angostas columnas rodeando los sinusoides sanguíneos lo que permite que estén bañadas directamente por sangre. Las proporciones de cortisol y corticosterona difieren marcadamente según las especies; así en humanos se secreta principalmente cortisol, mientras que en felinos se produce una mezcla y en roedores sólo se secreta corticosterona. El grosor de la zona fasciculata es más sensible a la regulación por la actividad del eje hipotalámico-hipofisario y la liberación de ACTH. Se observa hipertrofia e hiperplasia en respuesta a una prolongada elevación de los niveles de ACTH secretado por stress o manipulación de los niveles séricos de esta hormona proteica. Por otro lado, la zona fasciculata se atrofia marcadamente luego de la hipofisectomía o el tratamiento prolongado con glucocorticoides.

La zona reticularis bordea a la médula adrenal y contiene numerosas fibras reticulares. Es la fuente principal de andrógenos adrenales y también sintetiza algunos glucocorticoides. La zona reticularis también se hipertrofia en respuesta a ACTH y se atrofia luego de la hipofisectomía, aunque no tan marcadamente como la zona fasciculata.

Biosíntesis de esteroides

Generalidades

Las hormonas esteroideas producidas por la corteza adrenal son miembros de una larga familia de compuestos derivados de la estrucutura de anillos del ciclopentanoperhidrofenantreno. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal. Producen una amplia diversidad de efectos biológicos que dependen de las modificacions químicas del núcleo básico del esteroide. Estas

modificaciones incluyen la insaturación de las uniones C-C en los anillos y el agregado de hidroxilos, cetos y otros grupos específicos a los átomos de carbono [1,3].

Fuentes de colesterol para la síntesis de esteroides adrenales

Todas las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol. Las células de los tejidos esteroidogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato activado (acetil Coenzima A), movilizar las reservas intracelulares de ésteres de colesterol o importar colesterol unido a lipoproteínas del plasma. Aproximadamente el 80 % del colesterol proviene de las lipoproteínas circulantes en el plasma [5 y sus citas]. El tejido adrenal utiliza el colesterol asociado a las lipoproteínas, el cuál es captado por endocitosis específica mediada por receptor [6-8]. El tipode lipoproteína utilizada, de alta (HDL) o baja (LDL) densidad, depende de la especie estudiada. Los receptores a lipoproteínas se hallan presentes en células adrenocorticales tumorales murinas [6,9] y en tejido adrenal normal de diversas especies [5,7,10-13].

Las glándulas adrenales de ratas y ratones poseen receptores específicos para lipoproteínas de alta densidad (HDL) [7,14] aunque en la mayoria de las especies el HDL no parecería ser usado en la esteroidogénesis adrenal [5]

Los receptores de membrana específicos para LDL unen la LDL circulante y la internalizan mediante endocitosis mediada por receptor [15]. Los complejos LDL-receptor se concentran en regiones de la membrana plasmática denominados hoyos revestidos ("coated pits") que luego se invaginan para formar las vesículas revestidas ("coated vesicles") conteniendo al complejo receptor-LDL. Las vesículas revestidas se fusionan con los lisosomas, donde los ésteres de colesterol son hidrolizados para liberar colesterol libre que puede así ser usado poseriormente como sustrato esteroidogénico [6].

La corteza adrenal puede también sintetizar colesterol a partir de acetato (acetil Coenzima A). En condiciones basales alrededor del 20 % de la capacidad esteroidogénica [5] depende de la biosíntesis intracelular de colesterol. En aquellos desórdenes fisiológicos en los que el transporte de colesterol exógeno se halla inhibido, la esteroidogénesis adrenal basal se halla en niveles normales. La betalipoproteinemia es una deficiencia hereditaria de la producción de apolipoproteína B debido a lo cual el

LDL se halla ausente en el plasma. Los pacientes con este desorden genético presentan niveles normales de producción de esteroides adrenales basales [1 y sus citas]. Asi también, en forma similar al caso anterior, los pacientes con hipercolesterolemia familiar poseen receptores a LDL defectuosos pero presentan esteroidogénesis basal normal. Sin embargo, a pesar de que la esteroidogénesis basal no es afectada por defectos en el transporte de colesterol extracelular, la esteroidogénesis estimulada por la administración prologada de ACTH no puede ser mantenida sólo por la síntesis *de novo* de colesterol. Estas observaciones indican que la existencia de un requerimiento absoluto de colesterol exógeno por la glándula adrenal para el mantenimiento y la modulación de la homeostasis a largo plazo, donde existen requerimientos cambiantes de los niveles de biosíntesis de hormonas esteroideas.

La cantidad de colesterol intracelular disponible para la esteroidogénesis adrenal está regulada por una retroalimentación negativa que es ejercida, entre otros, por la vía de la LDL para controlar la cantidad de colesterol libre intracelular en las células adrenocorticales. La captación de LDL suprime la síntesis de colesterol celular reduciendo la actividad de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la enzima limitante en la síntesis de colesterol. La esterificación del colesterol incorporado a la célula es estimulada y el número de receptores a LDL en membrana plasmática se reduce ("down regulation") como consecuencia de la captación de colesterol asociado a LDL [11,12]. ACTH incrementa el número de receptores a LDL en la superficie celular, la actividad de la estearasa de colesterol que produce colesterol libre a partir de los ésteres de colesterol incorporados por la LDL o en los depósitos de las gotas lipídicas y consecuentemente la cantidad de colesterol libre intracelular [1,16]. ACTH no estimula la actividad de la HMG-CoA reductasa ni altera la capacidad del LDL para suprimirla [1,16].

Caminos biosintéticos

Los citocromos P-450 son una larga familia de enzimas oxidativas que presentan un máximo de absorción a 450 nm cuando son reducidos con monóxido de carbono. Estos citocromos intervienen en una variedad de funciones biológicas que involucran la

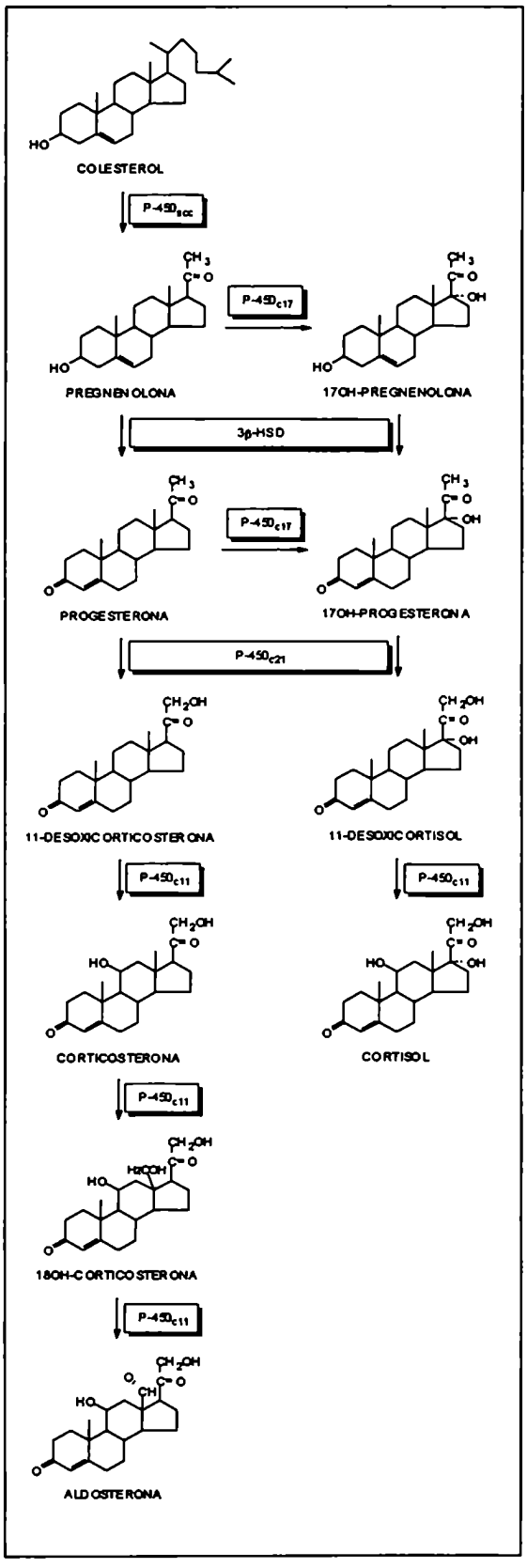


Fig. 1.2. Caminos biosintéticos de los glucocorticoides y mineralocorticoides.

transferencia de electrones desde los cofactores como NADH y NADPH, a través de intermediarios proteicos del transporte de electrones, al oxígeno molecular con la concomitante oxidación de los sustratos [17]. Los sustratos de los citocromos P-450 esteroidogénicos son varios anillos carbonados del colesterol. Por ejemplo, el citocromo P-450_{scc} ("side-chain cleavage", escición de la cadena lateral), una enzima mitocondrial adrenal, cliva la cadenal lateral del colesterol entre C-21 y C-23.

Cada paso enzimático en la biosíntesis esteroidogénica adrenal está compartimentalizado dentro de la célula en función de la localización subcelular de la enzima involucrada. A continuación se detallan brevemente los principales caminos biosintéticos que llevan a la producción de glucocorticoides y mineralocorticoides en la glándula adrenal (Fig. 1.2). El colesterol libre es transportado desde el citosol hasta la membrana interna mitocondrial, el sitio donde se localiza la primera enzima de la síntesis esteroidogénica. Previamente, una serie de factores proteicos ("SCP2" y "StAR protein", entre otros) regulan el pasaje del colesterol a la membrana interna mitocondrial, siendo éste, posiblemente, uno de los principales pasos limitantes de este camino metabólico [18]. Dentro de la mitocondria, el colesterol sufre una serie de oxidaciones en C-20 y C-22 catalizadas por el P-450_{scc} que llevan al clivaje de la cadenal lateral del colesterol y la formación de pregnenolona. Los electrones son transferidos al P-450_{scc} durante el clivaje de la cadena lateral a través de un sistema de transporte de electrones compuesto por la adrenodoxina, una proteína no hémica que continene hierro que se presenta en forma soluble en la matriz mitocondrial, y la adrenodoxina reductasa, una flavoproteína unida a la membrana interna mitocondrial. La adrenodoxina reductasa acepta los electrones del NADPH y los transfiere a la adrenodoxina, que funciona como un transportador de equivalentes reductores a varios citocromos P-450.

La pregnenolona es transformada a través de una serie de pasos que ocurren en el retículo endoplasmático en 11-desoxicorticosterona. Primero, la pregnenolona es convertida en progesterona mediante una deshidrogenación en el hidroxilo presente en C-3 y una isomerización del doble enlace en C-5. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ4,5-isomerasa (3β-HSD). Luego la pregnenolona sufre una hidroxilación en C-21 catalizada por el citocromo P-450_{c21} para generar 11-desoxicorticosterona. Los electrones requeridos para esta reacción son suministrados por una flavoproteína microsomal (distinta de la mitocondrial) que

transfiere los electrones desde el NADPH hasta el P-450$_{c21}$ (y también hasta el P-450$_{c17}$ que se describe posteriormente). Finalmente la 11-deoxicorticosterona es sustrato del citocormo P-450$_{c11}$. Se han aislado dos citocromos P-450$_{11\beta}$ hidroxilasas de adrenal de rata [19,20]. La 11β-hidroxilasa (CYP11B1) cataliza la conversión de 11-desoxicorticosterona en corticosterona y 18-hidroxidesoxicorticosterona. CYP11B1 sólo se expresa en las zonas fasciculata-reticularis, y tanto su expresión como su actividad son reguladas por ACTH [21,22]. Por otro lado, el citocromo 11β-hidroxilasa/aldosterona sintetasa (CYP11B2) convierte 11-desoxicorticosterona en corticosterona, 18-hidroxicorticosterona y aldosterona [21-23]. CYP11B2 se expresa en la zona glomerulosa [24,25] y es regulado por el sistema de renina angiostensina y por la ingesta de bajo sodio y/o alto potasio [26,27].Sistemas similares han sido hallados en humanos [28] y ratones [29]; sin embargo en bovinos y porcinos se han clonados dos isoformas de P-450$_{11\beta}$ que se hallan tanto en las zonas glomerulosa como fasciculata y llamativamente ambas producen la tranformación de 11-desoxicorticosterona en aldosterona *in vitro* [30]. Esto indicaría que, en estas dos últimas especies animales, la especificidad de la biosíntesis de aldosterona por la zona glomerulosa estaría dada por diferencias en la actividad de estas enzimas pudiendo deberse dicha modulación, entre otros factores, a diferencias en el entorno lipídico y/o a la distinta concentración de agentes antioxidantes [31,32].

El camino biosintético que lleva a la producción de aldosterona descripto anteriormente es común a todos los mamíferos estudiados. La corticosterona es el principal glucocorticoide de los roedores y su producción ocurre a través de la vía común que presenta con la aldosterona. Sin embargo, otras especies de mamíferos estudiadas, incluyendo al humano, expresan en la glándula adrenal un citocromo denominado P-450$_{c17}$ que cataliza la hidroxilacion en C-17 tanto de la pregnenolona como de la progesterona. La 17-OH-progesterona formada a partir de la pregnenolona por las vías P-450$_{c17}$-3β-HSD o 3β-HSD-P-450$_{c17}$ es sustrato del P-450$_{c21}$ que cataliza la conversión a 11-desoxicortisol, el cuál posteriormente es transformado por el P-450$_{c11}$ en cortisol.

Inhibidores de la esteroidogénesis

Existen diversos compuestos que son capaces de inhibir la esteroidogénesis adrenal bloqueando algunos de los pasos enzimáticos descriptos anteriormente [1,33] (Fig 1.3). A continuación se detallan aquellos utilizados en el presente trabajo.

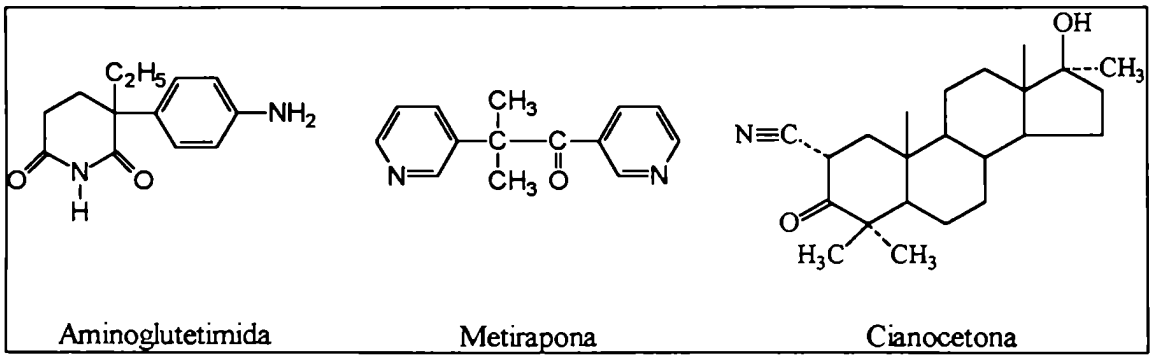


Fig. 1.3. Inhibidores de la esteroidogénesis.

Aminoglutetimida: La aminoglutetimida es un inhibidor del P-450$_{scc}$, que cataliza la conversión de colesterol en pregnenolona. Su administración *in vivo* resulta en un cuadro de hipocortisolemia y un incremento en la secreción de ACTH por la hipófisis debido a la ausencia de retroalimentación negativa del eje hipotalámico-hipofisario causado por el esteroide [34,35]. Como se bloquea el primer paso de la biosíntesis de esteroides se producen inhibiciones tanto de la glucocorticosteroidogénesis como de la aldosteronogénesis. La aminoglutetimida se usa en pacientes con el síndrome de Cushing causado por secreción autónoma de cortisol o ACTH.

Metirapona: La metirapona es un inhibidor del citocromo P-450$_{c11}$ que cataliza la conversión de 11-desoxicorticosterona en corticosterona y de 11-desoxicortisol en cortisol [36,37]. Este compuesto bloquea la producción de gluco- y mineralocorticoides [38] y se ha utilizado también en el tratamiento de pacientes con el síndrome de Cushing.

Cianocetona: La cianocetona es un inhibidor competitivo de la actividad de la 3β-HSD [39], probablemente debido a su similitud con la pregnenolona (ver Fig. 1.2 y 1.3). La cianocetona inhibe a la 3β-HSD en todos los tejidos esteroidogénicos reduciendo consecuentemente la producción de esteroides gonadales como adrenales.

Regulación de la secreción de gluco y mineralocorticoides

Regulación de la secreción de glucocorticoides

La secreción de los glucocorticoides por la zona fasciculata y la zona reticularis está bajo control directo del eje hipotalámico-hipofisario que involucra a las hormonas liberadora de corticotropinas (CRH, "corticotropin releasing hormone") y ACTH respectivamente [1,3]. Estímulos neurológicos provenientes del cerebro, por ej. en respuesta al "stress", causan la liberación en la sangre portal del eje hipotalámico-hipofisario de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), como así también de arginina vasopresina (AVP) y otros agentes, a partir de las neuronas hipotalámicas. Estas hormonas son llevadas a la hipófisis donde estimulan la liberación de ACTH en la sangre sistémica. CRH es la principal hormona liberadora de ACTH pero AVP también juega un rol fundamental potenciando el efecto de CRH. ACTH actúa en la adrenal causando un incremento en la síntesis y secreción de glucocorticoides y otros esteroides. La regulación por feedback negativo se completa con el efecto inhibitorio de los glucocorticoides en la síntesis y secreción de CRH y AVP en el hipotálamo y de ACTH en la hipófisis.

El estímulo del "stress" causa un importante incremento en la secreción de glucocorticoides que puede mantenerse por largos períodos.

Estructura y síntesis del POMC

El ACTH se sintetiza como parte de un largo precursor (241 aminoácidos en humanos) denominado pro-opiomelanocortina (POMC). El POMC también contiene las secuencias de otros polipéptidos, incluyendo a las lipotrofinas (LPHs), hormona estimulante de los melanocitos (MSH, "melanocyte stimulating hormone") y β-endorfina (β-END) [1,40,41]. El POMC sufre una larga serie de modificaciones post-traduccionales, incluyendo clivaje, glicosilación, fosforlilación, sulfatación, acetilación N-terminal y amidación C-terminal de ciertos péptidos. Se producen múltiples péptidos por clivaje enzimático del precursor del POMC. El clivaje es tejido específico, generándose ACTH en el lóbulo anterior de la hipófisis.

El ACTH es un péptido de 39 aminoácidos que estimula la secreción de glucocorticoides, andrógenos, y en menor medida de mineralocorticoides de la corteza adrenal. Los primeros 24 aminoácidos N-terminales son comunes en todas las especies estudiadas, existiendo mínimas diferencias en la porción C-terminal del péptido. La porción activa del ACTH son los 18 primeros aminácidos N-terminales; debido a la rápida degradación de esta molécula se usa el péptido ACTH (1-24) con propósitos clínicos ya que posee la misma potencia (determinada en mg requeridos para obener el mismo efecto) que la molécula original [42].

Acciones del ACTH en la corteza adrenal

La principal acción del ACTH en la corteza adrenal es incrementar la secreción de glucocorticoides mediante un aumento de su síntesis debido a que no existen depósitos esteroideos en la adrenal [1y sus citas,43,43]. ACTH depleta el contenido adrenal de colesterol, hecho que se correlaciona con un aumento de la síntesis de esteroides [44].

El ACTH actúa uniéndose a receptores específicos de la superficie celular [45-47].

Los efectos de ACTH en la esteroidogénesis pueden ser divididos en efectos agudos, que ocurren en minutos luego de la estimulación, y crónicos, que requieren horas o días para evidenciarse [1,18,48]. El efecto agudo de ACTH involucra la activación de las enzimas del camino biosintético de los esteroides (tanto mineralocorticoides como glucocorticoides) y de factores lábiles que estarían involucrados en el transporte del colesterol a la membrana interna mitocondrial [1,1,18,43,43y sus citas].

Los efectos crónicos de ACTH involucran una inducción de la síntesis de mRNA y proteína de las enzimas involucradas en la síntesis de glucocorticoides [18,48-51]. Estos incrementos de mRNA son especialmente llamativos en el citocromo P-450_{scc} y en la proteína regulatoria de la esteroidogénesis aguda ("StAR protein") [18,49].

Además de estimular la esteroidogénesis, ACTH estimula el crecimiento adrenal. Concentraciones suprafisiológicas de ACTH plasmática causan hipertrofia e hiperplasia adrenal; en cambio, se produce atrofia adrenal en ausencia de ACTH [52]. Uno de los primeros efectos de ACTH es aumentar el flujo sanguíneo adrenal [53]. Exposiciones prolongadas de la adrenal a altos niveles de ACTH provocan un incremento en la síntesis

total de RNA y proteínas, y posteriormente del contenido de DNA y del peso adrenal [52]. La remoción de una glándula adrenal en ratas causa el crecimiento compensatorio de la adrenal remanente por proliferación celular. Sin embargo, el rol de ACTH en este último proceso no está claro debido a que la administración de anticuerpos anti-ACTH en concentraciones tales que disminuyen la esteroidogénesis no modifican el crecimiento adrenal [54].

Regulación de la secreción de mineralocorticoides

La zona glomerulosa secreta aldosterona independientemente del control directo de la hipófisis. ACTH no sólo ejerce un efecto permisivo manteniendo la capacidad de respuesta de la glándula adrenal, sino que además es el más importante estímulo secretor de aldosterona cuantitativamente. Sin embargo, su importancia fisiológica es discutible ya que no existe un mecanismo de retroalimentación negativa del eje hipotalámico-hipofisario como en el caso de los glucocorticoides y además la secreción basal de aldosterona es normal en ausencia de ACTH endógeno. El efecto fisiológico más importante de la aldosterona es el mantenimiento del balance electrolítico de los fluidos corporales, y su segunda acción es la regulación del volumen del fluido extracelular. La aldosterona estimula la reabsorción de sodio hacia la sangre y la excreción de potasio en la orina por los nefrones del riñón. El principal mecanismo que controla la secreción de aldosterona es el sistema renina-angiotensina [1,3,55].

La renina es una enzima producida por el cuerpo yuxtaglomerular del riñón. Esta enzima es una glicoproteína secretada en una forma inactiva llamada prorrenina. La conversión de la prorrenina en renina ocurre por acción de la kalicreína. Un incremento en el volumen sanguíneo (sensado como presión dentro de las arteriolas renales) o una disminución en la concentración de sodio en el filtrado glomerular producen un incremento en la liberación de renina. Una vez en el torrente sanguíneo, la renina interactúa con su sustrato: el angiotensinógeno sintetizado en el hígado. La renina produce la liberación de un fragmento de 12 aminoácidos del angiotensinógeno denominado angiotensina I. Posteriormente, la enzima convertidora de angiotensina (ACE, "angiotensin converting enzyme") produce a partir de angiotensina I un heptapéptido denominado angiotensina II de vida media muy corta. La angiotensina II es

un potente agente vasoconstrictor que ayuda a restablecer la presión sanguínea por contracción del músculo liso vascular. Además, la angiotensina II estimula la síntesis y liberación de aldosterona de las células de la glomerulosa adrenal. Por hidrólisis de la angiotensina II se produce un heptapéptido denominado angiotensina III que también estimula la esteroidogénesis.

La aldosterona viaja por la sangre hacia los riñones donde estimula la reabsorción de sodio e incremente la excreción de potasio. Esta reabsorción de sodio es acompañada por una retención de agua, y consecuente disminución del volumen de orina, que ayuda a restaurar el volumen normal de los fluidos [56].

Por otro lado, existen otra serie de factores que regulan la secreción de aldosterona [1,3,55]. Altos niveles de potasio en los fluidos extracelulares estimulan directamente en la adrenal la secreción de aldosterona por la células de la glomerulosa. La aldosterona a su vez produce un aumento en la excreción de potasio en los riñones que cierra el ciclo de regulación. Como se mencionó anteriormente, ACTH y otros péptidos derivados de la degradación del POMC ejercen un efecto estimulatorio de la síntesis de aldosterona. Una serie de neurotransmisores como serotonina, norepinefrina, acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo, vasopresina y prostaglandinas son hallados en las inervaciones adrenales y poseen un efecto estimulatorio en la liberación de aldosterona. Por otro lado, existen péptidos que inhiben la secreción de aldosterona. El péptido atrial natriurético (ANP) es secretado por el corazón en respuesta a incrementos crónicos en el volumen sanguíneo y/o aumento de la presión. El ANP no sólo causa una inhibición en la secreción de aldosterona sino que además inhibe la liberación de vasopresina y directamente promueve la excreción de sodio y pérdida de agua en el riñón. Todos estos efectos producen una reducción en el volumen sanguíneo y en la presión arterial.

Finalmente, otro de los factores que estimula la secreción de aldosterona es un péptido secretado por el endotelio vascular denominado endotelina. La endotelina no sólo estimula la secreción de endotelina *per se* sino que además es un potenciador sinérgico de otros factores como ACTH y angiotensina II. A continuación se detalla en mayor profundidad la bioquímica y fisiología de la endotelina por haber sido utilizada en este trabajo.

Endotelina

El endotelio vascular juega un rol central en la regulación de la coagulación, transporte lipídico, reactividad inmunológica y tono vascular [57]. Las células endoteliales producen una importante serie de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. La primer sustancia de este tipo identificada fue la prostaciclina, la cual es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetária [58]. En 1980, se postuló la existencia de un vasodilatador derivado del endotelio que no era la prostaciclina [59]. Esta sustancia denominada "Factor relajante derivado del endotelio" (EDRF, "endothelium derived releasing factor") fue luego caracterizado como oxido nítrico [60]. El aislamiento del EDRF potenció la búsqueda de sustancias que contrarrestaran este efecto, denominadas genericamente como "Factor constrictor derivado del endotelio" (EDCF, "endothelium derived contracting factor"). En 1985, se observó que el endotelio vascular genera sustancias vasoconstrictoras que producen una vasoconstricción prolongada [61]. Este agente de larga vida media fue caracterizado como una sustancia peptídica, y en 1988 fue finalmente aislado y secuenciado de medios condicionados de cultivos de células endoteliales porcinas y denominado Endotelina (ET) [62]. Se han identificado 3 isoformas, endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3), compuestas de 21 aminoácidos cada una [63] (Fig. 1.4). Todas las ETs poseen cuatro residuos cisteina que forman dos puentes disulfuro intracatenarios, los cuales junto con el residuo triptofano N-terminal son esenciales para su actividad biológica [64]. Endotelina-1 es el péptido originalmente identificado por Yanasigawa M. *et al.* [62], y es el más potente vasoconstrictor conocido y la forma predominantemente expresada en la vasculatura [63,65].

La endotelina-1 es un potente vasoconstrictor, tiene propiedades ionotrópicas, mitogénicas y regula la homeostasis de sal y agua [66-71]. También estimula el sistema renina-angiostensina-aldosterona y el sistema nervioso simpático. Por lo tanto, el efecto global de las acciones de endotelina consiste en incrementar el tono vascular y la presión sanguínea. La endotelina, en consecuencia, jugaría un rol importante en la patofisiología cardíaca, y en enfermedades vasculares o renales asociadas con una vasoconstricción regional o sistémica. Las terapias anti-endotelina podrían ser beneficiosas en el

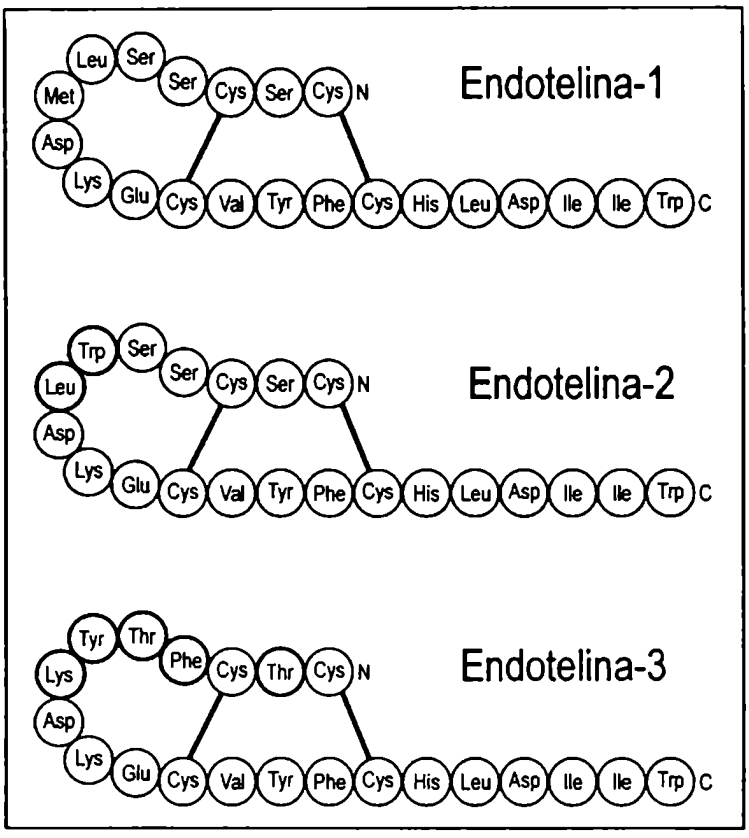


Fig. 1.4. Estructura de las endotelinas.
Los aminoácidos diferentes de los hallados en ET-1 se muestran en círculos en negrita.

tratamiento de enfermedades asociadas con una vasoconstricción crónica como en la hipertensión esencial, falla crónica del corazón o falla crónica renal [72].

Producción de Endotelina

Cada miembro de la familia de las endotelinas está representado por un gen separado que codifica para un precursor específico de la forma madura [63]. En la región flanqueante 5′ hay sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 y NF-1, que median la inducción del mRNA de ET-1 por Angiostensina II y el Factor de crecimiento tumoral β (TGF-β) respectivamente [65,73,74]. La región 3′ no codificante del mRNA contiene secuencias ricas en adenina y uracilo que median la desestabilización selectiva del mRNA de preproendotelina-1, dando cuenta de su corta vida media. La generación de ET-1 está incrementada por diversos estímulos, incluyendo hormonas vasoactivas,

factores de crecimiento, hipoxia, "stress" por fricción, lipoproteínas, radicales libres, endotoxinas y ciclosporina [66,68,70 y sus citas,75]. Por otro lado, la producción de ET-1 está inhibida por estímulos que actúan incrementando la concentración intracelular de cGMP, incluyendo al óxido nítrico, péptidos natriuréticos, heparina y prostaglandinas.

El mayor sitio de producción de ET-1 son las células endoteliales vasculares [63,65,76], aunque también se sintetiza en corazón, riñón, hipófisis posterior y sistema nervioso central. ET-2 presenta un patrón de expresión similar a ET-1 pero ET-3 se expresa selectivamente en los sistemas endócrino, gastrointestinal y nervioso pero no en células endoteliales [77-79].

El producto inicial de la expresión del gen de ET-1 es la preproendotelina-1, un péptido de 212 aminoácidos (Fig. 1.5). La proendotelina-1 es formada por remoción de una corta secuencia secretoria y luego es clivada por la furina para generar un péptido de 38 aminoácidos denominado "big-endotelina-1" [62], que no presentaría actividad biológica [80]. La ET-1 madura es formada por clivaje de la "big-endotelina-1" por la enzima convertidora de endotelina (ECE, "endothelin converting enzyme"). La ECE comprende una familia de metaloproteasas de las cuales existen variantes solubles y ancladas a membrana como asi también pueden existir tanto en las células productoras (ej. células endoteliales) como en las células blanco de ETs (ej, células del músculo liso vascular) [76,81,82].

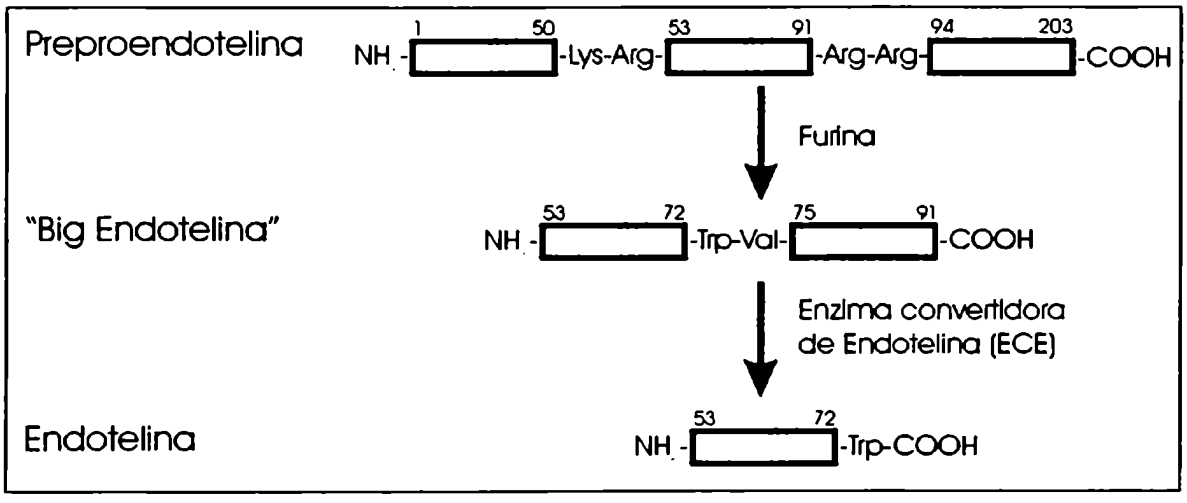


Fig. 1.5. Esquema del procesamiento proteolítico de la preproendotelina para generar endotelina madura.

Las concentraciones plasmáticas de ET están en el orden pM siendo mucho menores que las concentraciones necesarias para producir constricción vascular *in vitro* e *in vivo*. Las concentraciones de ET en la interfase entre las células endoteliales y vasculares serían mayores, ya que las células endoteliales secretan la mayor parte de la ET en la cara que da a las células musculares que lo que lo hacen al lumen [75,77].

La ET es rápidamente eliminada del torrente sanguíneo luego de una inyección intravenosa, con una vida media de 1 min, aunque el efecto vasoconstrictor dura más de 60 min [83]. La eliminación del plasma es mediada por receptor y ocurre principalmente en pulmón y riñón [83,84].

Receptores de Endotelina y sistema de señales intracelulares

Se han descripto dos subtipos de receptores a ET denominados ET_A y ET_B. El receptor ET_A posee una alta afinidad por ET-1 y ET-2 mientras que ET_B posee alta afinidad por las tres ETs [85,86]. El receptor ET_A se expresa preferencialmente en aorta, corazón, riñón, adrenal y células del músculo liso vascular [87]. El receptor ET_B se expresa preferencialmente en las células endoteliales vasculares [88], dónde su activación lleva a la producción de sustancias vasodilatadoras como óxido nítrico y prostaglandinas. El receptor ET_B también se expresa en las células del músculo liso vascular [89] donde mediaría la vasoconstricción [90] y en adrenal [91-96] donde estimula la aldosteronogénesis [91,96-104].

Los receptores a ET pertenecen a la superfamilia de los receptores que se unen a proteínas G con siete regiones hidrofóbicas transmembrana y un largo dominio extracelular N-terminal. El número de receptores a ET está regulado por una serie de factores; la isquemia y la ciclosporina incrementan el número de receptores [105] mientras que ET-1, angiostensina II y los ésteres de forbol disminuyen su número [95,106,107].

La unión de ET-1 a los receptores ET_A o ET_B producen la activación de fosfolipasa C dependiente de proteína G. Esto lleva a la hidrólisis del fosfatidil inositol y la generación de inositol trifosfato citosólico y diacilglicerol en la membrana plasmática [96,108-110]. El inositol trifosfato causa un rápido incremento en la concentración intracelular de

calcio mediante su liberación de reservorios intracelulares [111]. Un incremento más sostenido del calcio intracelular ocurre a través de la apertura de canales de Ca^{2+} de membrana [96,108,111]. El diacilglicerol activa a la proteína kinasa C (PKC), incrementando la sensibilidad del aparato de contracción a cambios en la concentración de Ca^{2+} [112]. El diacilglicerol también activa los mecanismos de señalización nuclear – con posibles efectos a largo plazo en la función celular y el crecimiento- e incrementa el pH intracelular a través de sus efectos en la bomba sodio-hidrógeno. Además, existe evidencia por estudios *in vitro* e *in vivo* que ET-1 cierra los canales de K^+ [113,114]. El cierre de estos canales previene el eflujo de K^+ de las células, favoreciendo la despolarización de la membrana y la contracción del músculo liso. Finalmente, ET-1 puede activar la fosfolipasa A_2, aumentando la generación de prostaciclina y tromboxano A_2 [75].

Acciones de Endotelina

Sistema cardiovascular

ET-1 causa una contracción sostenida de los conductos arteriales con una potencia más de 10 veces mayor que los otros agentes vasoconstrictores conocidos [62]. Las tres ETs causan una vasodilatación transitoria dependiente del endotelio antes de provocar la vasoconstricción [68,70] (Fig. 1.6).

La resistencia de los vasos y las venas es particularmente sensible al efecto de ET-1 [57]. La vasoconstricción causada por ET-1 sería mediada por ambas subpoblaciones de receptores en las células del músculo liso vascular [79,89,90]; mientras que sólo los receptores ET_B de las células endoteliales mediarían la vasodilatación a través de la generación de óxido nítrico y prostaciclinas. La infusión de ET-1 en animales causa un corto período de hipotensión seguido de un largo período de hipertensión lo cual es causado por una vasodilatación transitoria seguida de una vasoconstricción duradera en las vasculaturas coronarias, renales y esplácnicas [62,115,116]. La disminución del flujo sanguíneo y el aumento de la presión arterial perdura luego de más de dos horas de interrumpida la infusión [62,115].

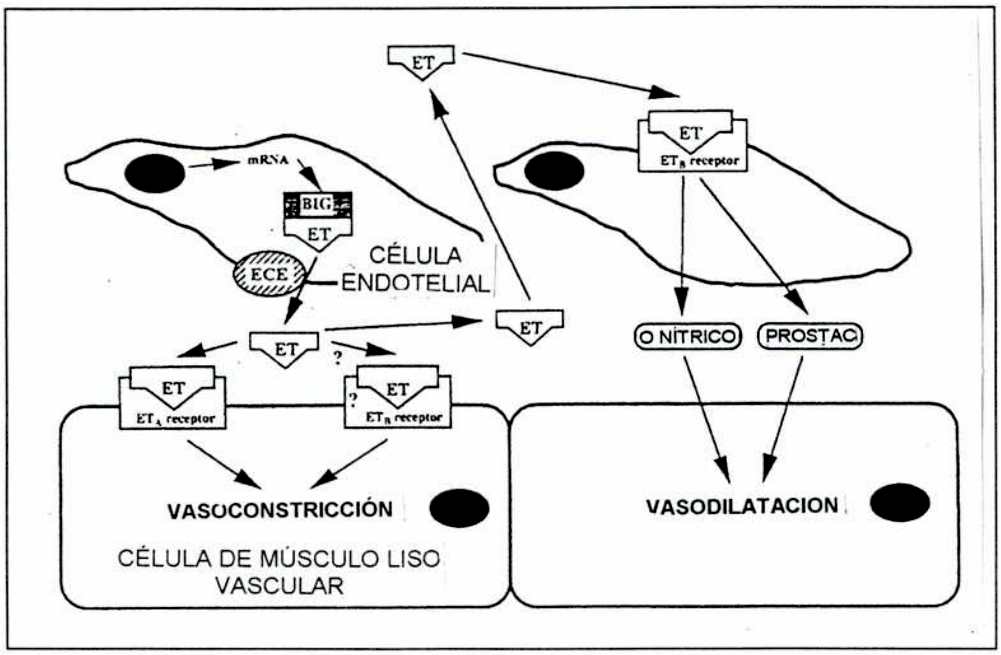


Fig. 1.6. Acciones vasculares de ET.
Reproducido de [75].

Las ETs estimulan la generación de óxido nítrico y prostaciclinas por las células endoteliales vasculares [117]. La vasodilatación transitoria producida por ET-1 es atenuada por inhibidores de la síntesis de óxido nítrico, aunque más relevante fisiológicamente, es el hecho de que inhibidores de la síntesis de ambos compuestos vasodilatadores potencian los efectos vasoconstrictores y de aumento de presión de ET-1 [118].

La ET-1 se halla involucrada también en el mantenimiento del tono vascular basal. Esto se infiere de experimentos realizados con individuos normotensos que fueron tratados con antagonistas de ET o con inhibidores de la enzima convertidora (ECE) observándose en todos los casos una disminución de la presión arterial [119,120].

Otros tejidos

ET-1 no sólo regularía la presión sanguínea a nivel sistémico sino que además posee efecto a nivel del sistema nervioso, ya que la administración intracerebroventricular de dosis de ET-1 que no producen efecto en la presión arterial a nivel sistémico aumenta la

presión sanguínea en forma aguda y crónica a través de la estimulación de los centros simpáticos [121-123].

ET-1 también posee un efecto mitogénico en las células del músculo liso vascular [124], miocitos cardíacos [125] y células glomerulares [126]. En células adrenocorticales bovinas, sin embargo, presenta un efecto antimitogénico [95].

ET-1 posee dos efectos principales en el riñón, causando vasoconstricción renal y pérdida de agua y sodio tubular, probablemente reflejando distintos sitios de producción en vasos sanguíneos y túbulos renales [75].

ET-1 contrae la arteriolas aferentes y eferentes *in vitro* por lo que reduce la tasa de filtración glomerular y el flujo plasmático renal [127,128]. La infusión de un antagonista de los receptores ET_A produce vasodilatación renal en perros [120], sugiriendo que la endotelina endógena vascular contribuye al tono vascular renal basal. En humanos, los antagonistas de ET disminuyen la resistencia vascular renal en un 10 % sin modificar la tasa de filtración glomerular [76], sugiriendo que el efecto predominante de la ET endógena ocurre en la arteriola eferente. Bajas dosis de ET aumentan la excreción de sodio [126,128]. Esto se evidencia porque: i) ET bloquea la reabsorción de sodio inhibiendo la Na^+/K^+-ATPasa [129], ii) ET bloquea la reabsorción de agua en el conducto colector inhibiendo los efectos de la hormona antidiurética [130,131] y iii) la producción de ET disminuye por incrementos de la osmolaridad *in vitro* y por reducción del volumen *in vivo* [132].

Sistema endócrino

Aparte de los conocidos efectos de ET a nivel cardiovascular, sorprendentemente se han hallado receptores a ET y producción de ET en diversos órganos endócrinos llevando a la suposición de que los efectos sistémicos de ET no se debían sólo a su acción a nivel de los vasos sanguíneos sino además a una compleja interacción con diversos factores endócrinos [71].

En hipotálamo e hipófisis se ha demostrado la presencia de ET, especialmente ET-3, como así también de receptores a ET [133]. Estos receptores parecerían ser distintos a los anteriormente descriptos y se postula que sean un tercer subtipo denominados

receptores ET_C [71]. La secreción de ET-3 por las células de la hipófisis es estimulada por insulina, factor de crecimiento similar a insulina I y II (IGF-I y IGF-II, "insulin like growth factor I y II") e inhibida por el factor de crecimiento tumoral β (TGF-β, "tumor growth factor β") [134]. Por otro lado, ET posee un importante efecto regulatorio de la secreción de prolactina en la hipófisis anterior. ET ejerce una respuesta bifásica, observándose una estimulación transitoria de la secreción de prolactina por los lactotrofos seguida de una inhibición duradera pero reversible de la liberación de prolactina [135-137]. ET también estimula la secreción de la hormona luteneizante [135,138-140]. La secreción de ACTH no es afectada *in vitro* en cultivos de células hipofisarias estáticos como dinámicos [136]. Sin embargo, la administración *in vivo* de ET-3 intracerebroventricular produce un incremento en los niveles plasmáticos de ACTH en forma dosis dependiente, sugiriendo que ET se halla involucrada en la estimulación del eje hipotalámo-hipófisis-adrenal [141].

En el hipotálamo ET produce un aumento en la secreción de vasopresina y oxitocina [142,143]. La infusión intravenosa con ET produce un aumento en los niveles plasmáticos de vasopresina en perros concientes y anestesiados [102,103,144]. Por otro lado, la inyección intracerebroventricular de ET-3 produce un aumento en la presión sanguínea como así también en los niveles plasmáticos de vasopresina y oxitocina en conejos y ratas [122,145]. Como se describió anteriormente, vasopresina ejerce un efecto facilitador de la acción de CRH en la liberación de ACTH por lo que este incremento de vasopresina ejercido por ET sería otro de los mecanismos por los cuales ET puede regular el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

En las glándulas adrenales se ha descripto la presencia de receptores específicos a ET [91-94] los cuales se expresan preferencialmente en la zona glomerulosa [93-95]. En la corteza adrenal se expresan las dos subpoblaciones de receptores a ET, ET_A y ET_B, [91,96,98,146] mientras que en la médula sólo se expresan los del tipo ET_B [147,148].

ET-1 estimula la secreción de aldosterona en cultivos primarios de células de glomerulosa bovina [91], de conejo [97], rata [96,98-101] y humano [99]. Cuando ET es infundida *in vivo* en perros [102,103] y ratas [98,100,104] producen un incremento en la actividad de renina plasmática y en la concentración plasmática de aldosterona [102-104,149].

ET-1 también magnifica significativamente el efecto aldosteronogénico de angiotensina II [150] y ACTH [150,151].

La administración crónica de ET *in vivo* produce hipertrofia de la zona glomerulosa de la adrenal [98] debido a la proliferación de las células de dicha zona lo cual se evidencia por un aumento del índice mitótico. Este efecto mitogénico es aditivo con el causado por ACTH pero no ocurre lo mismo con angiotensina II y vasopresina [152]. El aumento de la concentración plasmática de aldosterona es acompañada por un aumento en el volumen mitocondrial y la proliferación del retículo endoplasmático evidenciado por microscopía electrónica [98] dos organelas involucradas en la esteroidogénesis. Sin embargo, Cozza E.N. *et al.* [95] observaron que ET produce una disminución de la incorporación de timidina en cultivos primarios de células de glomerulosa bovina. Esta discrepancia de resultados podría deberse a que *in vivo* ET podría no sólo estar ejerciendo un efecto directo sobre la adrenal sino también produciendo respuestas indirectas.

Exiten datos contradictorios respecto a la estimulación de la zona fasciculata y la secreción de cortisol (o corticosterona). Mientras algunos autores reportan la ausencia de efecto de ET sobre la secreción [98,100,153], otros han informado la estimulación dosis dependiente en rata [99,154] y humano [99].

ET-1 ejerce su efecto en la médula adrenal incrementando la liberación de epinefrina y norepinefrina [155,156].

Se ha observado la presencia de ET en células de la zona glomerulosa principalmente y con menores niveles en las células endoteliales y en la zona fasciculata mediante inmunocitoquímica [157]. El hallazgo de receptores a ET y de inmunoreactividad a ET en las mismas células o en las contiguas lleva a postular que posiblemente en la adrenal, asi como en otros tejidos como se mencionó anteriormente, ET ejerza un efecto autócrino o parácrino. Esto es reforzado por el hecho de que las concentraciones plasmáticas de ET se hallan en niveles mucho menores a las necesarias para producir efectos fisiológicos relevantes.

La liberación de ET por la glándula adrenal es estimulada por ACTH y por incrementos en el flujo de infusión [99,154,158]. Se ha detectado ET en las células endoteliales de la adrenal, la cual podría ejercer un efecto parácrino ya que se ha observado que la infusión

con antagonistas de los receptores ET_A causa vasodilatación en la adrenal mientras que la infusión con ET causa vasoconstricción con la consecuente disminución del flujo del eluido de infusión [159].

Las gónadas también son tanto órganos blanco de las ETs como también órganos productores de éstas. El ovario presenta tanto receptores a ET [160] como secreción de esta hormona [160,161]. ET es secretada por células de la granulosa porcina y luteales de rata en cultivo [161,162]. El tratamiento crónico *in vivo* con gonadotrofina coriónica humana produce un aumento en la secreción de ET por el ovario [162]. Se sugiere que ET estaría involucrada en la regulación de la esteroidogénesis ovárica y en el desarrollo del folículo [71]. ET produce un incremento dosis dependiente en la síntesis de progesterona y esteroides sexuales en el ovario [160], aunque, contradictoriamente inhibe a distintas enzimas esteroidogénicas como el citocromo $P\text{-}450_{scc}$ y la 3β-HSD [163].

El testículo también presenta tanto receptores a ET [164,165] como inmunoreactividad a ET-1 [166]. En este tejido ET estaría involucrada en la regulación de la esteroidogénesis [165,167] y en el transporte de esperma regulando la contracción del músculo liso [164].

Agonistas y antagonistas

Gran parte del avance en el estudio de la fisiopatología de la ET se debe al descubrimiento y desarrollo de agonistas y antagonistas específicos para el/los receptor/es de esta hormona [66,67,72,75,168,169]. A continuación se describen algunos de ellos (ver Fig. 1.7).

Las sarafotoxinas son los más conocidos agonistas de los receptores ET_B [170,171]. Forman una familia de cuatro compuestos denominados S6a, S6b, S6c y S6d aislados del veneno de la serpiente *Atractaspis engaddensis*, siendo los más utilizados S6b [170] y S6c [171]. Las sarafotoxinas son péptidos de 21 aminoácidos con dos puentes disulfuro semejantes estructuralmente a las ETs. Las sarafotoxinas inducen vasoconstricción coronaria, se unen con alta afinidad al atrio y cerebro de rata, y activan la hidrólisis de fosfoinosítidos [170].

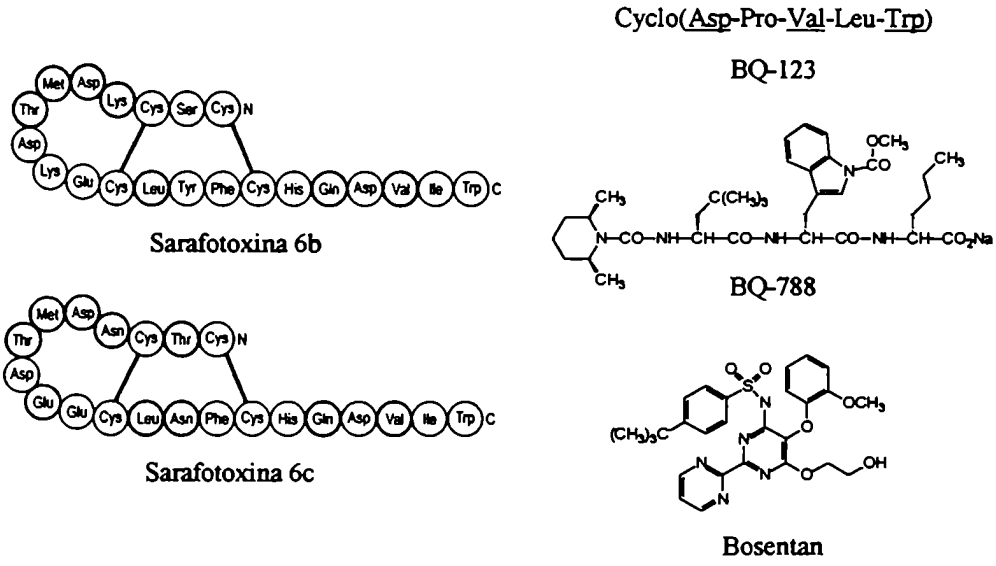


Fig. 1.7. Agonistas y antagonistas de los receptores de endotelina. En las sarafotoxinas, los aminoácidos diferentes de los hallados en ET-1 se muestran en negrita. En BQ-123 los D-aminoácidos se muestran subrayados.

Dos compuestos denominados BQ-123 [172,173] y BQ-788 [174] [175]han sido ampliamente utilizados como antagonistas de los receptores ET_A y ET_B respectivamente. BQ-123 es un derivado de un péptido aislado de los productos de fermentación de *Streptomyces misakiensisy* [172]. La administración de BQ-123 en la arteria braquial de sujetos con hipertensión esencial causa vasodilatación del antebrazo en un grado similar al observado en pacientes normotensos [176,177].

La vasodilatación transitoria inducida por ET-1 no es modificada por BQ-123 pero si por BQ-788 indicando que ocurre por un mecanismo que involucra a los receptores ET_B. Por otro lado, la vasoconstricción duradera inducida por ET-1 es mediada por los receptores ET_A, ya que sí es modificada por BQ-123 y no por BQ-788 [174].

Entre los antagonistas no selectivos se encuentra el Bosentan (Ro-47-0203, Roche) que tiene la ventaja de poder ser administrado por vía oral [72,178]. Un reciente estudio clínico con pacientes con moderada hipertensión esencial mostró que el Bosentan reduce la presión arterial en aproximadamente 10 mm Hg sin producir cambios en el ritmo cardíaco y sin activación del sistema nervioso simpático o del sistema renina-angiotensina [179].

11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa

Como se mencionó anteriormente, las distintas hormonas esteroideas actuan principalmente uniéndose a sus respectivos receptores citoplasmáticos o nucleares. El complejo hormona-receptor ejerce su efecto regulando la transcripción de genes específicos mediante la unión a secuencias genómicas respondedoras a estas hormonas. Según este modelo, los efectos biológicos de una hormona esteroidea podrían ser predichos según su capacidad de unirse y activar un receptor en particular. Sin embargo, se han observado situaciones en las que la acción de estas hormonas es modificada por su metabolismo en distintos tejidos. Asi, por ejemplo, la testosterona es convertida por la acción de la 5α-esteroide reductasa en dihidrotestosterona, un agonista mucho más potente que su predecesor, en ciertos órganos blanco de los andrógenos [180]. Esto demuestra que desde la secreción de la hormona esteroidea por el órgano productor hasta su interacción con el receptor pueden existir una serie de pasos enzimáticos de activación o inactivación que modulen su actividad biológica.

Los primeros indicios de que los glucocorticoides podían sufrir alguna modificación de este tipo se observó cuando comenzaron a ser usados en la clínica. En 1949 se dispuso por primera vez de cortisona (el derivado 11-oxidado del cortisol) y se observó su eficacia para tratar cuadros de inflamación como la artitris reumatoidea cuando era administrada en forma sistémica [181 y sus citas]. Sin embargo, cuando la cortisona era inyectada directamente en la articulación era muy poco efectiva. Cuando dos años más tarde se realizaron estudios con cortisol, se observó que este compuesto era igualmente efectivo tanto cuando se lo administraba en forma sistémica como intraarticular [181 y sus citas].

En esa misma época, estudios con pacientes que sufrían del síndrome de Cushing demostraron que el principal producto secretado por la adrenal era el cortisol [182]. Además, la cortisona administrada en forma sistémica era secretada parcialmente como cortisol. Esto sugiere que la cortisona sistémica sólo es activa cuando se convierte en cortisol y, la cortisona administrada intraarticular no produce efecto porque en ese sitio no debe estar presente la enzima que realiza esa interconversión. Esa enzima es justamente la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD).

Generalidades

La 11β-HSD cataliza la interconversión entre el glucocorticoide activo cortisol (corticosterona en roedores) y su derivado inactivo la cortisona (11-dehidrocorticosterona en roedores) (Fig. 1.8) [181,183-188]. La 11β-HSD pertenece a la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) [188-190]. En la actualidad, se han caracterizado y clonado dos isoformas de la 11β-HSD (11β-HSD-1 y 11β-HSD-2) con distintas características bioquímicas y funciones fisiológicas como se detalla a continuación.

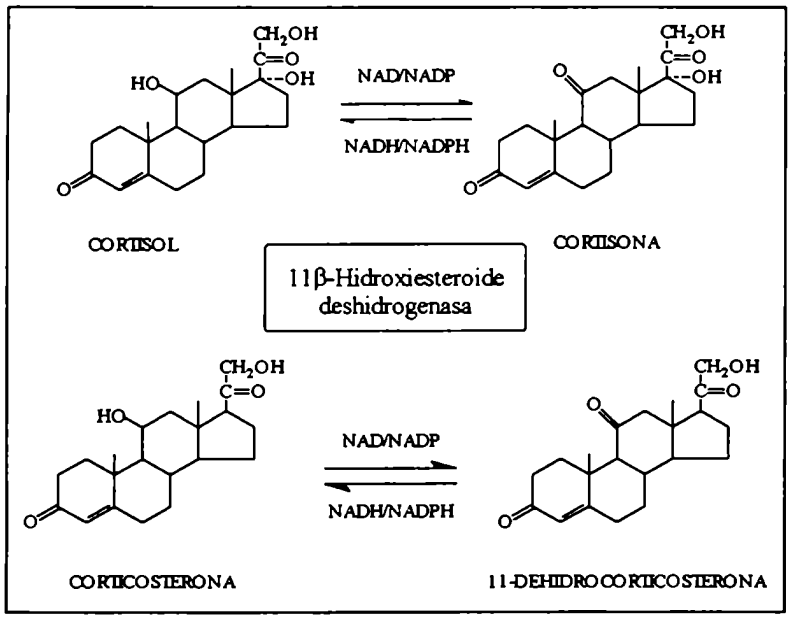


Fig. 1.8. Reacciones catalizadas por la 11β-HSD.

Características de la 11β-HSD-1

La 11β-HSD-1 se expresa en altos niveles en el hígado. En homogenatos, las actividades de deshidrogenasa y reductasa han sido demostradas en presencia de $NADP^+$ y NADPH como cofactores respectivamente. Estas actividades se hallan en la fracción microsomal [191]. En sistemas libres de células la 11β-HSD-1 se comporta como una deshidrogenasa y no se detecta actividad de reductasa en la enzima purificada. La

enzima purificada a homogeneidad presenta un valor de K_m aparente para los sustratos esteroideos 11-reducidos, cortisol y corticosterona, en el rango micromolar [192]. Una vez purificada a homogeneidad la 11β-HSD-1 de higado de rata fue utilizada para obtener anticuerpos que posteriormente fueron usados para el clonado del cDNA de esta isoforma [193]. Más tarde, se obtuvieron las secuencias de los cDNA de esta isoforma de distintas especies como humano [194], ratón [195], mono [196] y oveja [197].

El valor de K_m para los sustratos esteroideos de la 11β-HSD-1 es llamativamente elevado ya que es más de dos órdenes de magnitud superior al de los niveles circulantes de cortisol (1-100 nM). Mientras que la actividad de reductasa resultó inestable en homogenatos, la enzima clonada de rata se comportó predominantemente como una reductasa en células transfectadas de mucosa de vejiga de sapo [198] y células Cos-1 [199]. Además, diversas evidencias experimentales indican que la 11β-HSD-1 se comporta como una deshidrogenasa *in vivo*. La administración de carbenexolona, inhibidor de la 11β-HSD, incrementa la sensibilidad hepática a insulina y disminuye la producción de glucosa, sin afectar la sensibilidad a insulina del antebrazo, indicativo de una inhibición de la actividad de 11-reductasa hepática [200]. Estudios de expresión de la 11β-HSD-1 humana en forma estable o transitoria en células de mamífero muestran que la enzima posee mayor afinidad por corticosterona (aproximadamente K_m 270 nM) que por cortisol (K_m 1.8 μM) [196,201,202]. Estos resultados son consistentes con los hallados en tejido adiposo estromal en cultivo, tejido con abundante expresión de 11β-HSD-1, donde la reacción predominante es la conversión de cortisona en cortisol [203]. En fibroblastos de piel humana la actividad de reductasa es entre 5 y 10 veces mayor que la de deshidrogenasa [204]; en forma similar, en cortes de aorta de rata la actividad preponderante es de reductasa [205]. La adición de 11-dehidrocorticosterona potencia el efecto neurotóxico de los glucocorticoides en cultivos de células de hipocampo, indicando la conversión al glucocorticoide activo la corticosterona [206]. Recientemente se han producido ratones homocigotas para la deleción del gen de la 11β-HSD-1 [207]. Estos ratones presentaron una completa incapacidad para convertir 11-dehidrocorticosterona en corticosterona *in vivo* lo que produjo una menor activación de la enzimas clave de la gluconeogénesis hepática debido a menores niveles intrahepáticos de glucocorticoides.

Los análisis por Western-blot indicaron que la 11β-HSD-1 se expresa como una proteína de 34 kDa en hígado, testículo, riñón y pulmón, mientras que formas menores de PM 26 kDa se hallan en cerebro [208]. La proteína posee un extremo N-terminal hidrofóbico que precede al dominio de unión al cofactor, sugiriendo que esta región ancla a la proteína a la membrana. Por otro lado, los análisis por Northern-blot indicaron que la 11β-HSD-1 se expresa en la mayoría de los tejidos como un mRNA de 1.7 kb excepto en el riñón donde el uso de promotores adicionales da origen a múltiples mRNA de menor tamaño que incluso codifican para proteínas de menor PM [209-212]. Posteriores estudios revelaron la existencia de una tercer isoforma de la 11β-HSD-1 en oveja como resultado de la eliminación del exon 5 del mRNA [213]. Estas tres proteínas son denominadas 11β-HSD-1A, 11β-HSD-1B y 11β-HSD-1C respectivamente. El mRNA de la 11β-HSD-1B sólo se expresa en riñón de rata y sus niveles acompañan la expresión durante el desarrollo de la 11β-HSD-1A [210]. Estudios inmunológicos previos habían sugerido la presencia de tres isoformas de la 11β-HSD-1 en riñón y dos en hígado [208]. Hasta el momento no se ha demostrado que la 11β-HSD-1B y 11β-HSD-1C presenten actividad enzimática [213,214]. Sin embargo, la asociación de la 11β-HSD-1A con la carbonil reductasa en el hígado de ratón sugeriría que podría actuar con otros sustratos incluyendo xenobióticos [215-217].

El examen de la secuencia proteica de la 11β-HSD-1 reveló la presencia de dos posible sitios de glicosilación en la enzima clonada de rata, lo que es consistente con la descripción original de la 11β-HSD-1 como una glicoproteína [192]. Estudios de inhibición de la glicosilación en sistemas de expresión en células de mamífero revelaron que este tratamiento disminuye la actividad de deshidrogenasa en un 50 % mientras que no afecta a la actividad de reductasa [218]. La importancia de los dos sitios de glicosilación fue posteriormente estudiada en estudios de mutagénesis en células CHO. La modificaciñón del primer sitio (NXS, 158-160) disminuye las actividades de deshidrogenasa y reductasa en un 75 % y 50 % respectivamente comparado con la enzima normal, mientras que la mutación del segundo sitio (NXS, 203-205) causa una pérdida completa de ambas actividades [219]. Estos resultados indican que la glicosilación de la 11β-HSD-1 de rata en la posición N203 juega un rol crucial en la

actividad, lo cual es coherente con la conservación de este motivo en las distintas especies estudiadas.

Características de la 11β-HSD-2

Luego de ser caracterizada la 11β-HSD-1, se comenzaron a observar distintos indicios que indicaban la existencia de una segunda isoforma de la 11β-HSD. Estudios inmunohistoquímicos de la 11β-HSD-1 en riñón de rata mostraron que la enzima no co-localizaba con el receptor de mineralocorticoide, hallándose en el túbulo proximal mientras que los sitios de unión para aldosterona están localizados en el nefrón distal [220-222]. Aunque los estudios antes mencionados revelaban la ausencia de inmunoreactividad en el nefrón distal, estudios de microdisección del nefrón de conejo indicaban la existencia de actividad de 11β-HSD en el nefrón distal y los túbulos colectores [223]. Posteriormente fue identificada y aislada una nueva actividad de 11β-HSD NAD^+ dependiente (11β-HSD-2) de células de túbulo colector cortical de conejo [224]. Resultados similares fueron observados mediante ensayos de determinación de actividad enzimática y técnicas inmunocitoquímicas en riñón de rata [225,226]. La alta eficiencia de deshidrogenación de la 11β-HSD-2 quedó claramente demostrada en experimentos donde se observó que toda la corticosterona era convertida en 11-dehidrocorticosterona al atravesar una monocapa de células corticales de conejo crecidas en una membrana permeable [224]. La 11β-HSD-2 es más de 100 veces más afín por corticosterona que la 11β-HSD-1 y la reacción catalizada es unidireccional [227]. La 11β-HSD-2 purificada de placenta humana presentó un valor de K_m de 14 nM para corticosterona y 55 nM para cortisol [228]. Resultados similares fueron obtenidos en estudios cinéticos posteriores con riñón humano [201]. La 11β-HSD-2 posee un mecanismo catalítico ordenado donde primero se une el NAD^+ seguido por la unión del sustrato esteroideo con alta afinidad inducido por un cambio conformacional de la proteína [229].

La 11β-HSD-2 fue clonada a partir de riñón de humano [230] y oveja [231] utilizando técnicas de clonado por expresión en células de mamífero u oocitos de *Xenopus*. La 11β-HSD-2 humana consta de 405 aminoácidos y tiene un PM calculado en 44 kDa, sin

embargo en geles de poliacrilamida con SDS presenta un PM aparente de 40-41 kDa [229,232]. La 11β-HSD-2 como la 11β-HSD-1 presenta un dominio N-terminal hidrofóbico que la anclaría a la membrana del retículo endoplasmático. Sin embargo, la eliminación de este segmento no produce la solubilización de la enzima sugiriendo que otras regiones del polipéptido se hallan invoucradas en el anclaje. A diferencia de la 11β-HSD-1, la deleción del dominio N-terminal no anula la actividad enzimática determinada en células enteras y sólo modifica levemente el K_m; sin embargo, no se observa actividad de estas mutantes en preparaciones libres de células [233].

Posteriormente, la 11β-HSD-2 fue clonada en otras especies, incluyendo la rata [234], ratón [235] y conejo [236]. La secuencia proteica de la 11β-HSD-2 está altamente conservada hasta el residuo 382 de la secuencia humana. Luego de este punto, el largo de los péptidos varía y su grado de conservación disminuye entre las especies [188]. La deleción de esta región produce un incremento de cuatro veces en el K_m para cortisol [233].

La 11β-HSD-2 se localiza en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear externa [186,237,238]. Sin embargo, la localización intracelular de la 11β-HSD-2 es aún motivo de controversia. Así por ejemplo Stewart P.M. ha propuesto en otros estudios una localización nuclear de esta enzima [202,239].

Estudios de entrecruzamiento sugieren que la 11β-HSD-2 existe como un dímero, lo que estaría de acuerdo con las observaciones realizadas en otros miembros de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) que existen como dímeros o tetrámeros [233]. Esto estaría avalado por el hecho de que la co-expresión de polipéptidos mutantes y normales en cultivos celulares produce una reducción de la actividad enzimática de la molécula proteica normal [240].

La 11β-HSD-2 humana posee un potencial sitio de glicosilación, sin embargo, cuando este sitio es mutado o la enzima es tratada con N-glicosidasa no se modifica su PM [241]. Por otro lado, cuando células transfectadas en forma estable con la 11β-HSD-2 de rata son tratadas con tunicamicina no se altera su actividad enzimática [242]. Estos resultados indicarían que probablemente la 11β-HSD-2 no sea una glicoproteína a diferencia de la 11β-HSD-1 que sí lo es.

Bioquímica del metabolismo del cortisol

Dado que la 11β-HSD se halla involucrada en reacciones enzimáticas que llevan a la activación/inactivación de los glucocorticoides, a continuación se discutirá brevemente el metabolismo de estos y las modificaciones que sufren en el organismo.

El cortisol plasmático se halla unido con una alta afinidad a una proteína transportadora denominada globulina ligadora de corticosteroides (CBG, "corticosteroid binding globulin") que lo protege de la degradación [243]. La vida media normal del cortisol en plasma es entre 60 y 80 min, en contraste con otros esteroides como la aldosterona que presentan una vida media de menos de 20 min debido principalmente a una menor afinidad por las proteínas plasmáticas.

El hígado y el riñón son los principales órganos involucrados en la metabolización y eliminación de los glucocorticoides de la circulación. El metabolismo disminuye la actividad biológica de estas hormonas e incrementa su solubilidad en agua debido a su conversión en metabolitos más hidrofílicos que pueden ser excretados en la orina. El cortisol libre se halla presente en la orina pero sólo representa el 0.1 % de los metabolitos totales del cortisol [1].

Primero, el hidroxilo en posición C-11 del cortisol puede ser oxidado a un grupo ceto por la 11β-HSD generando cortisona. Posteriormente, el cortisol y la corticosterona son metabolizados de forma similar (Fig 1.9). El doble enlace en C-4,5 es reducido; si el hidrógeno en posición 5 es añadido en la orientación β, el producto es 5β-dihidrocortisol, mientras que la reducción 5α produce 5α-dihidrocortisol. En circunstancias normales, la reducción en la posición 5β es la predominante. Luego, el grupo ceto en posición 3 también puede ser reducido; la reducción 3α está ampliamente favorecida sobre la 3β. Los productos de estas reducciones son tetrahidrocortisol (THF) (si ocurrió reducción 5β del cortisol), alo-tetrahidrocortisol (aTHF) (si ocurrió reducción 5α) y tetrahidrocortisona (THE). THF y THE son rapidamente conjugados con ácido glucurónico y excretados por la orina. El tetrahidrocortisol y la tetrehidrocortisona también pueden sufrir reducción en C-20 para generar cortol y cortolona respectivamente. Otras transformaciones posibles incluyen: i) la hidroxilación en

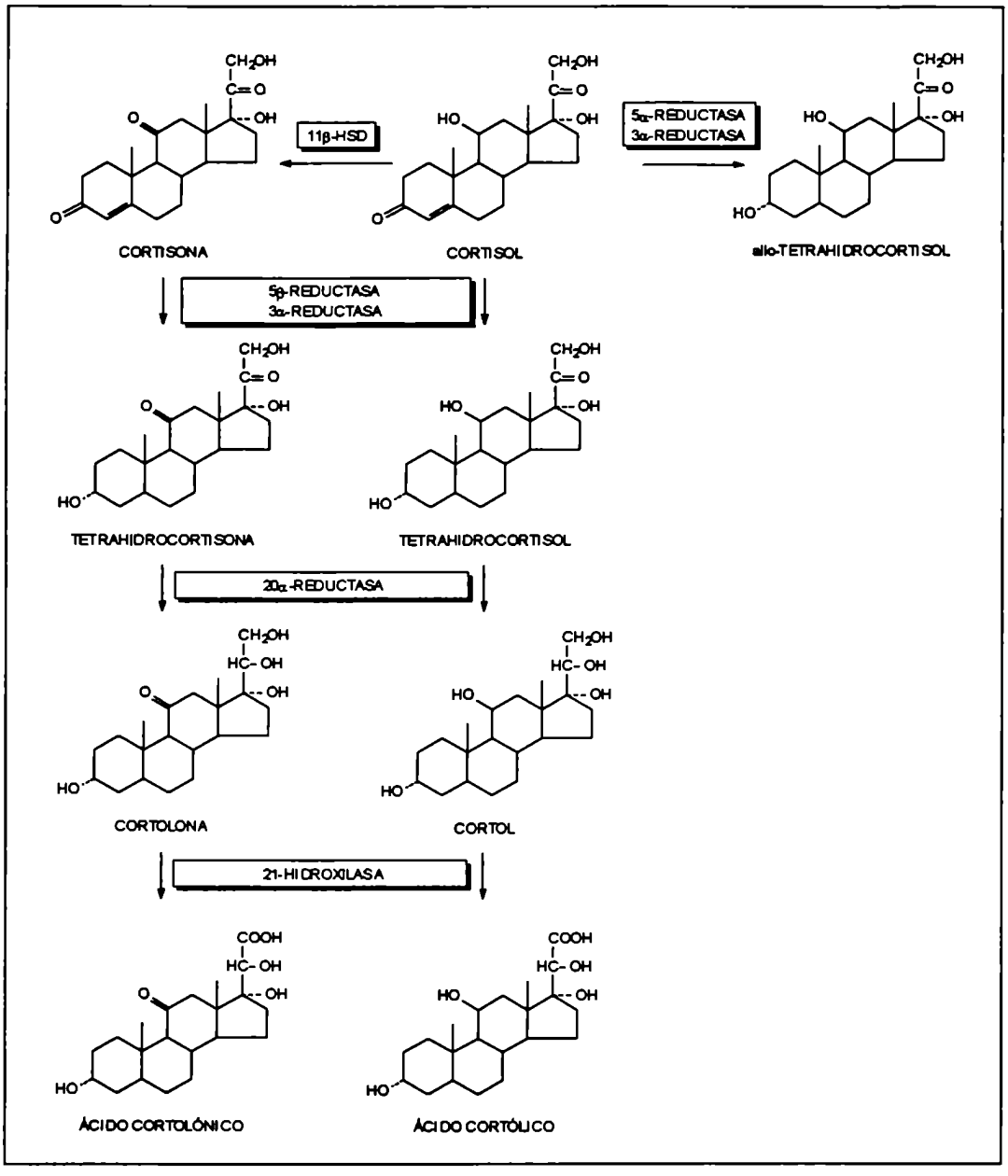


Fig. 1.9. Metabolismo del cortisol.

posición 6β que ocurre principalmente en la vida fetal y en la infancia, ii) el clivaje de THF y THE para producir los esteroides C-19 11-OH- y 11-oxo- androsterona y 11-OH- y 11-oxo- etiocolanolona, iii) la oxidación en posición C-21 del cortol y cortolona para generar los extremadamente polares ácidos cortólico y cortolónico.

Aproximadamente el 50 % del cortisol secretado se halla en la orina como THF, aTHF y THE, 25 % como cortol y cortolona, 10 % como esteroides C-19 y 10 % como ácidos cortólico y cortolónico. El resto de los metabolitos secretados son esteroides libres.

Del conjunto de metabolitos del cortisol y la cortisona excretados, por lo menos el 90 % se hallan como conjugados sulfatados o glucuronatos. La conjugación del cortisol o la cortisona pueden ocurrir en la posición 21 y los esteroides 3α-reducidos pueden también ser conjugados en la posición 3α [1,181].

El prinicipal sitio de metabolización del cortisol ha sido siempre considerado el hígado. Sin embargo, muchas de las enzimas antes mencionadas han sido halladas en el riñón, siendo especialmente notable la inactivación de cortisol en cortisona por la 11β-HSD.

La aldosterona, por otro lado, también es metabolizada en el hígado y los riñones. Este mineralocorticoide sufre reducciones y conjugación para luego ser excretado por la orina como 3-glucuronato de tetrahidroaldosterona. La aldosterona no es metabolizada por la 11β-HSD porque en solución acuosa, el hidroxilo en posición C-11 se cicla con el aldehido en C-18 formando un grupo hemiacetálico.

La actividad biológica de los glucocorticoides se debe en parte a la presencia de un grupo hidroxilo en posición C-11 de la estructura esteroidea. El cortisol y el principal glucocorticoide en roedores, la corticosterona, son esteroides activos mientras que la cortisona y la 11-dehdrocorticosterona poseen un grupo ceto en C-11 lo cula los hace inactivos. Por lo tanto, cualquier tejido que exprese la 11β-HSD puede regular su exposición a los glucocorticoides activos.

Funciones del receptor de mineralocorticoides

Acciones de la aldosterona

La aldosterona regula la excreción de electrolitos y el volumen intravascular principalmente a través de sus efectos en el túbulo contorneado distal renal y el túbulo colector cortical, donde actúa incrementando la reabsorción de sodio de la orina a través de por lo menos dos mecanismos [1,3,56]. El primer paso de la reabsorción de sodio es por difusión pasiva a través de canales permeables a sodio de la membrana apical de las células epiteliales del túbulo contorneado distal y el túbulo colector. La aldosterona incrementa el número aparente de estos canales. Esto puede reflejar un incremento en el porcentaje de tiempo que cada canal está abierto, posiblemente por metilación del canal,

y/o por un incremento en el número de canales [244]. La aldosterona también incrementa la síntesis de la Na^+/K^+-ATPasa localizada en la membrana basolateral, lo cuál genera un gradiente electroquímico que aumenta la difusión a través de los canales de sodio [245].

Aunque existen receptores de membrana para aldosterona, la mayoría de los efectos de la aldosterona son mediados por receptores citoplasmáticos específicos conocidos receptores de mineralocorticoides o "de tipo 1".

Estos receptores se expresan en altos niveles en el túbulo contorneado distal renal y en los túbulos colectores corticales pero también se hallan en otros órganos blanco de los mineralocorticoides, incluyendo la glándula salival y el colon. También se hallan en múltiples sitios en el cerebro y en bajos niveles en el miocardio y en la vasculatura periférica.

Estructura y función del receptor de mineralocorticoides

La secuencia del receptor de mineralocorticoides posee un alto grado de identidad de secuencia con el receptor de glucocorticoides o "de tipo 2" [246]. Estos receptores son poco semejantes en sus dominios N-terminales (< 15 % idénticos). En el receptor de glucocorticoides, esta región interactúa con otros factores de trasncripción nucleares y posiblemente posee una función similar en el receptor de mineralocorticoides [247]. El centro de la molécula contiene el dominio de unión al DNA consistente en dos "dedos de zinc"; esta región está involucrada en la dimerización del los receptores unidos al ligando. La secuencia de aminoácidos de los receptores de gluco-y mineralo-corticoides poseen una identidad de secuencia del 94 % en esta región. El extremo C-terminal es el dominio de unión al ligando y posee entre un 57 y 60 % de similitud entre ambos receptores.

En forma similar al receptor de glucocorticoides, el receptor de mineralocorticoides sin ligando se halla principalmente en el citoplasma [248]. Luego de unir al ligando, el receptor se transloca al nucleo donde se dimeriza y une a las secuencias respondedoras a hormonas en las regiones 5′ de los genes específicos incrementando su transcripción.

Cuando el cDNA que codifica para el receptor de mineralocorticoides fue clonado y expresado [246], se observó que este receptor presenta constantes de unión muy

similares para la aldosterona y los glucocorticoides cortisol y corticosterona. Observaciones similares fueron realizadas con el receptor de mineralocorticoides aislado de hipocampo de rata hallándose idénticas afinidades para aldosterona y corticosterona [249,250]. Sin embargo, esto no concordaba con el hecho experimental de que corticosterona y cortisol son muy poco potentes como mineralocorticoides *in vivo*.

Originalmente se propuso que estas discrepancias en la especificidad de ligandos por el receptor de mineralocorticoide en el hipocampo y el riñón resultaban de la presencia de una globulina ligadora de corticosteroides extravascular en el citosol renal pero no en el hipocampo. La globulina ligadora de corticosteroides, que también circula en la sangre, puede secuestrar cortisol y corticosterona pero no aldosterona [249,251]. Sin embargo, esta hipótesis perdió sustento al observarse que el receptor de mineralocorticoides renal de ratas neonatas posee un comportamiento similar al del adulto, a pesar de los bajos niveles de globulina ligadora de corticosteroides en los animales recién nacidos [252].

Un estudio más reciente sugiere que la aldosterona y los glucocorticoides no se comportan de forma idéntica frente al receptor de mineralocorticoides; la aldosterona aparentemente se disocia mucho más lentamente del receptor que los glucocorticoides y el complejo receptor-aldosterona transactiva genes reporteros mucho más eficientemente que el complejo receptor-corticosterona [253]. Sin embargo, este estudio demostró efectos de aldosterona a concentraciones por debajo de la requerida para observar efectos *in vivo*.

Hipótesis: La 11β-HSD-2 proteje al receptor de mineralocorticoides

Un mecanismo que confiere especificidad al ligando del receptor de mineralocorticoides fue deducido de estudios en dos condiciones en los que la especificidad normal del receptor se hallaba afectada, el síndrome de aparente exceso de mineralocorticoides (AME) y la intoxicación por regaliz. Estas condiciones poseen tres características en común: i) el cortisol actúa como mineralocorticoide en forma mucho más potente que en condiciones normales, ii) la vida media del cortisol se halla incrementada y iii) la excreción urinaria de los metabolitos de la cortisona está disminuida respecto de los del

cortisol, indicando que la actividad de la 11β-HSD, la enzima que cataliza la conversión de cortisol en cortisona, está disminuida.

Se ha propuesto que mientras el AME representa una deficiencia congénita de esta enzima, la intoxicación con regaliz, también denominado raíz dulce o "licorice" en inglés, resulta de una inhibición farmacológica de la 11β-HSD [181,254]. En cualquier caso, las concentraciones intrarrenales de cortisol pueden ser anormalmente elevadas como consecuencia de un metabolismo deficiente por la 11β-HSD y puede por lo tanto saturar el receptor de mineralocorticoides. Este modelo fue avalado por estudios de distribución tisular de la actividad de 11β-HSD y del receptor de mineralocorticoides [220,255]. La actividad de 11β-HSD fue mayor en tejidos como el riñón y la glándula parótida dónde los receptores de mineralocorticoides son específicos para aldosterona y es baja en hipocampo y corazón, tejidos donde los glucocorticoides pueden unirse al receptor de mineralocorticoides. Además, la inhibición de la 11β-HSD en varios tejidos por los compuestos activos del regaliz resultan en una pérdida de especificidad de ligando que se evidencia por un incremento de la capacidad de estos tejidos o los citosoles provenientes de éstos de unir glucocorticoides.

Por lo tanto, se hipotetizó [220,255] que la oxidación por la 11β-HSD de cortisol o corticosterona a cortisona y 11-dehidrocorticosterona respectivamente, representan el mecanismo fisiológico que le confiere especificidad por la aldosterona al receptor de mineralocorticoides (Fig. 1.10). Aunque el cortisol y la corticosterona se unen al receptor adecuadamente *in vitro*, la cortisona y la 11-dehidrocorticosterona son malos agonistas de este receptor. Cabe recordar que la aldosterona es un mal sustrato de la 11β-HSD porque, en solución, se encuentra normalmente en conformación hemiacetálica.

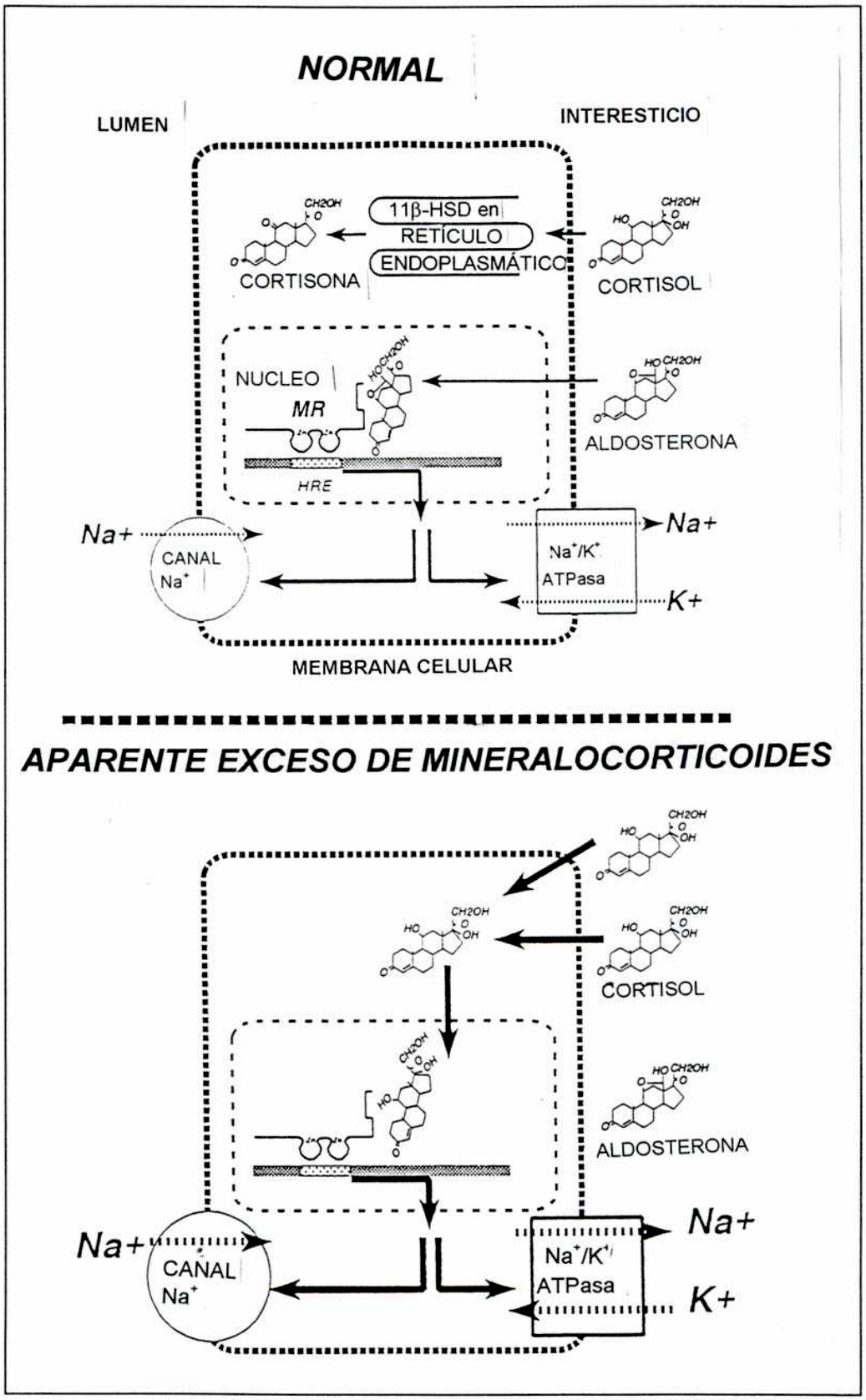


Fig. 1.10. Síndrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides.
Reproducido de [181].

Pérdida de función de la 11β-HSD

Síndrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides

Características clínicas

Hace más de 20 años fue descripto un síndrome hipertensivo predominantemente en niños que se manifiesta con signos de hipertensión, hipocaliemia y bajos niveles de actividad de renina y aldosterona plasmática, todos síntomas de un exceso de mineralocorticoides. Una dieta baja en sal o el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona disminuyen la presión sanguínea. Por otro lado, ACTH incrementa la hipertensión. Por lo tanto, se sospechó inicialmente que estos pacientes poseían elevados niveles de un mineralocorticoide desconocido inducible por ACTH, pero los niveles de todos los mineralocorticoides conocidos se hallaban en el rango normal, incluyendo por supuesto a la aldosterona [256,257]. Por esta razón, este síndrome fue denominado de "Aparente Exceso de Mineralocorticoides" (AME. "Apparent Mineralocorticoid Excess").

[258]. Este síndrome puede ser distinguido clinicamente de otro síndrome similar, el síndrome de Liddle, por la respuesta terapeútica a espironolactona [181]. Los pacientes con el síndrome de Liddle no responden al bloqueo del receptor de mineralocorticoide pero pueden ser tratados por un bloqueo directo de los canales de sodio del túbulo renal ya que este síndrome es causado por mutaciones en la subunidades β o γ del canal de sodio, lo que produce una activación constitutiva del mismo [259,260].

Otros síntomas clínicos observados en los pacientes con AME incluyen un retardo moderado del crecimiento intrauterino y una disminución del crecimiento post-natal [181,188,256,258,261-263]. Como consecuencia de la severa hipocaliemia se produce nefrocalcinosis y diabetes insipidus nefrogénica, lo que lleva a poliurea y polidipsia. Los efectos deletereos en el tejidos muscular van desde incrementos en la creatinina fosfoquinasa hasta rabdomiolisis.

En algunos pacientes, la hipertensión tiende a ser lábil causada por "stress" emocional como factor desencadenante. Las complicaciones de la hipertensión pueden incluir accidentes cerebrovasculares. Algunos pacientes han muerto durante la infancia o la

adolescencia. Las razones de su deceso no están claras pero incluirían un desbalance electrolítico que lleva a arritmias cardíacas o secuelas vasculares de la hipertensión.

Varios casos de hermanos con el síndrome de AME han sido informados, aunque los padres generalmente son asintomáticos sugiriendo que el AME es un desorden genético con herencia autosomal recesiva [181,263,264]. Sin embargo, anormalidades ocasionales, incluyendo hipertensión y alcalosis hipocaliémica, han sido observadas en los padres [261].

Hallazgos bioquímicos

Los pacientes con AME sufren de un metabolismo anormal del cortisol. Primero se observó la existencia de un incremento en la relación de metabolitos 5α-reducidos de cortisol respecto de los metabolitos 5β-reducidos [257]. Por esta razón, en un principio se propuso que el 5α-dihidrocortisol podría ser el mineralocorticoide responsable de los síntomas pero los niveles absolutos de este esteroide no se hallaban elevados en estos pacientes respecto de los individuos normales. Por otro lado, se observó que la vida media del cortisol se hallaba incrementada de 80 a 120-190 min [258,263]. Cuando se administró cortisol marcado a pacientes con el síndrome de AME se observó que la excreción de los metabolitos de la cortisona se hallaban muy disminuida, indicando una marcada deficiencia en la 11β-deshidrogenación. Sin embargo, si a los mismos pacientes se les administraba cortisona marcada, ésta se excretaba completamente como cortisol y otros metabolitos 11β-reducidos indicando que la 11-reducción no se hallaba alterada [258].

La excreción urinaria de los metabolitos totales del cortisol se hallaba disminuida, pero estos pacientes no presentaban ningún síntoma del síndrome de Addison, y los niveles séricos de cortisol eran normales. Probablemente, estos hallazgos son consecuencia de la prolongada vida media plasmática del cortisol lo que produce supresión de la secreción de ACTH. en concordancia con esto último, la excreción de cortisol se incrementa drasticamente por la administración de ACTH [181,256].

Estos hallazgos sugieren que el cortisol *per se* estaría actuando como un potente mineralocorticoide en estos pacientes. Esto se confirmó por la administración de cortisol

que agravó la hipertensión y la hipocaliemia en forma dosis-dependiente [265]. Por otro lado, la administración de aldosterona no tiene efecto en la presión arterial; esto probablemente se deba a saturación de los receptores de mineralocorticoides por el cortisol.

El parámetro bioquímico más frecuentemente utilizado para el diagnóstico de este desorden ha sido la relación precursor-producto lo cual es un reflejo de la actividad de la 11β-HSD -la suma de las concentraciones urinarias de tetrahidrocortisol (THF) y alo-tetrahidrocortisol (aTHF) dividido por la concentración de tetrahidrocortisona (THE): (THF+aTHF)/THE [183,188,266]. La actividad relativa de la 5β-reductasa se mide como la relación de los metabolitos 5α-reducidos a los 5β-reducidos: aTHF/THF. Aunque ambas relaciones son anormales en pacientes con AME [263,266], las dos relaciones están linealmente relacionadas, y la relación (THF+aTHF)/THE es usualmente más alta que la relación aTHF/THF, indicando que el defecto primario de este desorden es la 11β-deshidrogenación.

Bases moleculares

El conocimiento de la estructura y secuencia del gen de la 11β-HSD-2 permitió la identificación de mutaciones en pacientes con el síndrome de AME. El gen de la 11β-HSD-2 humana tiene 6.2 kb de largo, está compuesto por 5 exones, y está localizado en el cromosoma 16q22 [267]. No existe homología génica entre la 11β-HSD-2 y la 11β-HSD-1. El gen de la 11β-HSD-1 humana presenta 6 exones, tiene más de 13 kb de largo y se localiza en el cromosoma 1 [194]. Es muy importante recalcar que no se han hallado mutaciones en el gen de la 11β-HSD-1 en pacientes con AME.

Hasta el momento se han reportado 17 mutaciones en el gen de la 11β-HSD-2 en 27 pacientes con AME [262,268-271]. Sólo dos pacientes son heterocigotas y en ellos cada alelo codifica para una enzima inactiva [262]. Todos los demás pacientes con AME son homocigotas para mutaciones que causan pérdida total o parcial de la actividad enzimática de la 11β-HSD-2. Aunque se han descripto dos mutaciones (R337C y P227L) que sin embargo presentan una actividad de deshidrogenasa no despreciable, la mutación

causa un incremento en el valor de K_m sugiriendo que el cortisol intracelular se halla igualmente elevado lo que le permiten ocupar el receptor de mineralocorticoides. Todos los pacientes con AME presentan mutaciones en el gen de la 11β-HSD-2. El síndrome de AME es una enfermedad autosomal recesiva que se observa preferentemente en familias cosanguíneas [262,269]. Una mutación única es evidente en tres familias homocigotas para la mutación R337HΔ3nt que resulta de la deleción de 3 nucleótidos en dos codones. Una de estas familias es Zoroastrianos de Irán y las otras son del área de Bombay, donde estos grupos religiosos emigraron en el siglo séptimo [262,272]. Esta mutación también surgido independientemente en un individuo heterocigota japonés [268]. La homocigosis en el síndrome de AME se supone que surge por endogamia o por mutaciones como ocurre en familias de aborígenes nativos de América del Norte. El hallazgo de que 6 familias de este origen étnico presenten casos de heterocigosis permitió especular que estos individuos presentaran una mayor capacidad para conservar la sal bajo condiciones de privación extrema de sodio [181]. Los heterocigotas generalmente no presentan cuadros clínicos, sin embargo estudios *in vitro* sugieren que la estabilidad y actividad de los heterodímeros de la 11β-HSD-2 pueden estar comprometidos [240].

Tratamiento

Una dieta baja en sal, suplementación de potasio y administración de espironolactona han sido los tratamientos más frecuentemente utilizados como terapia para el síndrome de AME. Inhibidores de los canales de sodio como triamterina y amilorida también han sido usados con éxito para el tratamiento del AME. Aunque ACTH potencia los síntomas de este desorden, la supresión de la secreción de ACTH con dexametasona raramente ha sido efectiva en aminorar la hipocaliemia y la hipertensión. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, "angiotensin converting enzyme") como captopril activan la 11β-HSD renal y podrían teoricamente ser utilizados en pacientes con enzimas parcialmente activas [273]. Más recientemente, se ha informado el tratamiento de un paciente con AME mediante transplante de riñón [274].

Intoxicación con regaliz

El regaliz es un extracto de la raíz de la planta *Glycyrrhiza glabra* que ha sido utilizado como extracto saborizante y remedio homeopático por milenios [266]. Una de sus propiedades terapeuticas más importantes es que promueve la cicatrización de las úlceras gastrointestinales. El componente activo del regaliz es el ácido glicirretínico (Fig. 1.11) y su derivado hemisuccinato, la carbenexolona.

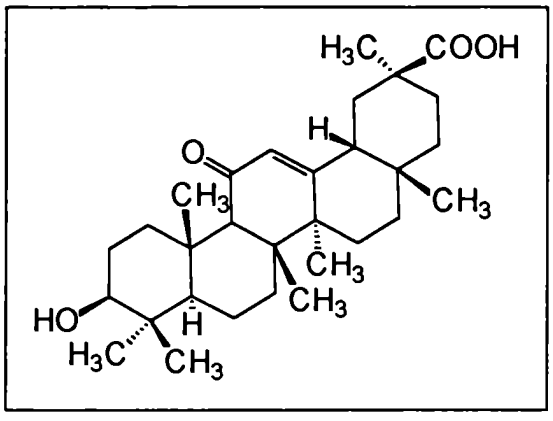


Fig. 1.11. Ácido glicirretínico

Se ha observado por más de 40 años que el regaliz tiene efectos secundarios indeseables del tipo mineralocorticoide que incluyen hipertensión, edema, falla cardíaca e hipocaliemia [181 y sus citas,275,276]. La hipocaliemia puede causar debilidad muscular y en casos severos rhabdomiolisis. Estos efectos secundarios son compartidos por el ácido glicirretínico y la carbenexolona. Aunque el uso terapeutico de la carbenexolona ha disminuido, el regaliz se utiliza como saborizante en confituras y gomas y tabaco para mascar. Facilmente, se puede ingerir cantidades suficientes de este compuesto para ocasionar problemas médicos [183,266,277].

Aunque los pacientes que sufren intoxicación por regaliz presentan síntomas de exceso de mineralocorticoides, los niveles de aldosterona en circulación son normales. La explicación más sencilla es que el regaliz y sus componentes activos poseen en si mismos actividad mineralocorticoide [278]. Esta idea fue considerada razonable ya que el ácido glicirretínico posee una estructura semejante a los esteroides. Sin embargo, el ácido glicirretínico y la carbenexolona se unen muy debilmente al receptor de mineralocorticoides (aproximadamente 15.000 veces menos afines que la aldosterona).

Además, no poseen efecto mineralocorticoide en pacientes o animales sin glándulas adrenales funcionales [181,279] sugiriendo que deben estar amplificando la acción mineralocorticoide de algún esteroide endógeno. En ratas tratadas con carbenexolona la administración de glucocorticoides desencadena respuestas mineralocorticoide que pueden ser bloqueadas con antagonistas del receptor de mineralocorticoides [280].

Cuando los humanos ingieren grandes cantidades de regaliz (50-200 g/día, equivalente a 300 mg de carbenexolona) presentan un patrón de excreción de esteroides similar al de los pacientes con AME aunque las anormalidades son menos pronunciadas. Presentan una disminución de la secreción de metabolitos de la cortisona y un incremento de la excreción urinaria de cortisol libre [254,281]. Efectos similares se han informado en ratas tratadas con ácido glicirrízico [282]. Esto sugeriría que el regaliz inhibe la 11β-HSD lo cuál fue confirmado en estudios como microsomas de riñón de rata [282,283]. Por lo tanto, la intoxicación con regaliz es un simil farmacológico reversible del síndrome hereditario de AME.

Sin embargo, es importante recalcar que el ácido glicirretínico inhibe otras enzimas incluyendo la 5β-reductasa, la 3β-deshidrogenasa y la 17β-deshidrogenasa [275,284]. Por lo tanto, no se puede asignar todos los efectos biológicos del regaliz exclusivamente a la inhibición de la 11β-HSD.

Síndrome de ACTH ectópico

Existen ciertos tumores, especialmente carcinomas de células pulmonares y médula tiroidea, que secretan ACTH e incrementan sus niveles muy por encima de los normales e incluso de los observados en pacientes con síndrome de Cushing por anormalidades en la hipófisis. Los pacientes con el síndrome de ACTH ectópico presentan niveles de cortisol plasmático elevados [285,286]. También presentan signos de exceso de mineralocorticoides cómo hipertensión y alcalosis hipocaliémica, aunque los niveles de aldosterona circulante son normales. La severidad de estos signos es mayor que la observada en pacientes con el síndrome de Cushing por anormalidades en la hipófisis. Estos pacientes tienen altas relaciones de cortisol a cortisona en plasma (3 veces lo normal) indicando que la 11β-HSD se halla saturada y es incapaz de deshidrogenar los

altos niveles circulantes de cortisol. Otras enzimas del metabolismo del cortisol, especialmente la 5α-reductasa, también están afectadas lo que se evidencia por las anormales relaciones urinarias de los metabolitos generados por esta enzima [285]. Los pacientes con síndrome de ACTH ectópico excretan altos niveles de cortisol libre en la orina.

La explicación más simple para estos hallazgos es que la enzimas que metabolizan el cortisol se hallan saturadas por los elevados niveles circulantes de cortisol, lo que permite al cortisol ocupar los receptores de mineralocorticoides renales. Sin embargo, no esta claro si la disminución de la actividad de 11β-HSD es el cambio fisiológico más importante en este desorden, considerando que la relaciones de cortisol a cortisona están sólo moderadamente elevadas y no se correlacionan con el grado de hipocaliemia. Tampoco está claro si el efecto observado en la 11β-HSD se debe a saturación de la enzima o a inhibición de la misma. La infusión de ACTH en seres humanos normales eleva los niveles de cortisol plasmático pero no los de cortisona mientras que la infusión de cortisol sí eleva los niveles de cortisona. Esto sugeriría que ACTH inhibe la 11β-HSD posiblemente debido a la secreción de otros esteroides adrenales como la corticosterona que inhiben competitivamente a la enzima [286-288].

Inhibidores endógenos de la 11β-HSD

Inhibidores endógenos de la 11β-HSD-1 en ensayos *in vitro* son excretados en la orina humana, los cuales se incrementan durante el embarazo. Debido a que el ácido glicirretínico, el componente activo del regaliz, es un inhibidor ampliamente utilizado de la 11β-HSD, los inhibidores endógenos de la 11β-HSD han sido denominados "factores semejantes al ácido glicirretínico" (GALFs, "glycyrrethinic acid like factors") [289].

Niveles elevados de GALFs circulantes podrían inhibir la actividad de la 11β-HSD y causar hipertensión arterial. Los estudios realizados para estudiar dicha hipótesis han arrojado resultados contradictorios. Un estudio cuantificó los GALFs utilizando microsomas de hígado de rata [290] y encontró que los GALFs no presentan un ritmo de excreción diario, que no se modifican luego del tratamiento con dexametasona o en pacientes con hipopituitarismo, síndrome de Cushing por hiperfuncionamiento

hipofisario y síndrome de ACTH ectópico. Por lo tanto, probablemente los GALFs no sean metabolitos de los esteroides adrenales. Los niveles de GALFs no se hallan incrementados en individuos hipertensos y no se correlacionan con la vida media del cortisol plasmático o con la relaciones (THF/aTHF)/THE. Otro estudio [291] cuantificó los GALFs utilizando microsomas de riñón humano, fuente principalmente de 11β-HSD-2. En este caso, individuos con hipertensión esencial con bajos niveles de renina excretan mayores cantidades de GALFs que los individuos normales. Los diferentes resultados hallados en estos estudios podrían deberse a las diferencias en las condiciones de ensayo y a la elección en el segundo caso de un subgrupo de los individuos hipertensos. Sin embargo, nuevamente no se halló ninguna correlación entre los niveles de GALFs y las relaciones (THF/aTHF)/THE.

El rol fisiológico de los GALFs aún no ha sido dilucidado. Los niveles de GALFs en pacientes normotensos son afectados por variaciones en la ingesta de sodio, y los niveles de estos inhibidores se correlacionan con la excreción de sodio [291]. Esto sugiere que el incremento en los niveles de GALFs observado en pacientes hipertensos con bajos niveles de renina sería probablemente una consecuencia y no una causa de la expansión en el volumen asociada con este tipo de hipertensión. Si los GALFs inhiben a la 11β-HSD *in vivo*, esto permitiría que los receptores de mineralocorticoides sean ocupados por el cortisol causando retención de sodio.

La identidad química de los GALFs aún no ha sido dilucidada. Los inhibidores pueden ser extraídos en cromatografía de fase reversa bajo condiciones que sugerirían una estructura esteroidea. Un posible candidato podría ser la 11βOH-progesterona que es un potente inhibidor de la 11β-HSD [242,292] y podría ser sintetizado *in vivo* a partir de progesterona. Sin embargo, este esteroide posee un tiempo de retención diferente a los GALFs en análisis por HPLC [291].

Roles de la 11β-HSD

Hígado

El hígado de humanos y roedores presenta expresión de 11β-HSD-1 pero no de 11β-HSD-2. La actividad de la 11β-HSD-1 confiere potencia biológica a los esteroides 11-oxidados como la cortisona. Cultivos primarios de hepatocitos humanos o de rata presentan exclusivamente actividad de 11-reductasa [293,294]. En las ratas, los niveles de expresión de la 11β-HSD-1 son 18 veces mayores en machos que en hembras [295-297]. Esto puede ser explicado por el dimorfismo sexual en la secreción de la hormona de crecimiento ya que ratas deficientes en la secreción de esta hormona no presentan dimorfismo sexual en la expresión de 11β-HSD [298]. La expresión de la 11β-HSD-1 en el hígado de roedores es afectada negativamente por los estrógenos y la insulina [296], pero una serie de factores de crecimiento como el factor de crecimiento tumoral β (TGFβ), el factor de crecimiento de fibrolblastos b (bFGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) no tienen ningún efecto [294]. La región promotora del gen de la 11β-HSD-1 fue clonada y es regulada en forma positiva por la proteína α con unión al "enhacer" CCAAT [299].

Estudios de disrupción del gen de la 11β-HSD-1 en ratón sugieren un rol crucial en la regulación de las enzimas gluconeogénicas hepáticas como ser la glucosa-6 fosfatasa y la fosfoenolpiruvato carboxikinasa [207]. En el hígado humano, la 11β-HSD-1 se localiza en forma centrípeta con máxima expresión alrededor de la vena central [300]. Las menores concentraciones intrahepáticas de glucocorticoides podrían explicar el incremento en la sensibilidad a insulina en humanos con la 11β-HSD inhibida por la administración de carbenexolona [200].

Riñón

Sitios de unión a aldosterona de alta afinidad han sido hallados por estudios de unión y autoradiografía [301], hibridizaciones *in situ* [302] e inmunohistoquímica [222,303,304] en los túbulos colectores cortical y medular, y en el túbulo contorneado distal. El receptor de mineralocorticoides no se expresa en los túbulos proximales, glomérulos y el

asa de Henle. Dentro del túbulo colector, dos tipos celulares pueden ser diferenciados, las células intercalares, involucradas principalmente con el transporte de H^+ y HCO_3^-, y las células principales transportadoras de sodio. El receptor de mineralocorticoides se expresa en ambos tipos celulares, aunque la expresión es mayor en la células principales [305].

La primer enzima caracterizada fue la 11β-HSD-1 de rata. Cuando se estudió su localización dentro del riñón se arribó a resultados desconcertantes. Mientras que los estudios de hibridización *in situ* determinaron la presencia de mRNA de 11β-HSD-1 en el nefrón distal [306,307], la inmunoreactividad fue detectada en los túbulos proximales de la corteza y en las células intersticiales de la médula [220-222]. No se observó inmunoreactividad contra 11β-HSD-1 en las células blanco de la aldosterona y, túbulo distal y colector. El mRNA de la 11β-HSD-2 fue detectado en el túbulo colector renal en el riñón humano [308], lo cual fue luego confirmado por diversos estudios inmunohistoquímicos [232,239,309]. El patrón de distribución en el feto de rata es puntiforme y no alcanza la distribución del adulto hasta 28 días luego del nacimiento [310]. La 11β-HSD-2 presenta una alta expresión en las células principales del túbulo colector de la corteza y en la médula excepto en las regiones terminales de la papila. El límite proximal de la alta expresión de 11β-HSD-2 es la estrecha unión entre el final distal de la porción gruesa del asa de Henle, por lo que se dice que la 11β-HSD-2 se halla en el túbulo conector y el túbulo contorneado distal.

En el riñón, la actividad de 11β-HSD-2 se incrementa por estrógenos [296,311] y presenta un patrón de expresión con dimorfismo sexual en el ratón [312]. La actividad de 11β-HSD de los túbulos colectores medulares internos disminuye por cargas agudas con ácidos [188]. En el síndrome de ACTH ectópico, se observa una menor conversión de cortisol en cortisona [286]. No parece existir un efecto directo de ACTH sobre la 11β-HSD-2 renal [287] aunque el "stress" agudo produce cambios en sus constantes cinéticas [313]. Altas dosis de dexametasona no modifican la actividad de 11β-HSD-2 en el riñón aunque si la incrementa en otros tejidos [314]. La vasopresina incrementa la actividad de 11β-HSD-2 en túbulos colectores de rata aislados a través de la vía del receptor V2 [315]. La cirrosis causa una disminución en la actividad de 11β-HSD renal y hepática, y la nefrectomomía causa un incremento de la actividad en el riñón

remanente [316,317]. La 11β-HSD-1 se expresa en cultivos de células mesangiales de rata dónde es regulada positivamente por interleuquina 1β y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) [318].

Otros tejidos blanco de los mineralocorticoides: colon, glándula salival y piel.

El colon humano presenta actividad de 11β-HSD que se localiza en la superficie mucosa de las células epiteliales [239,309,319]. El receptor de mineralocorticoides presenta una distribución similar [320] indicando una función de la 11β-HSD-2 similar a la ejercida en el riñón. La expresión de la 11β-HSD-1 está restringida a las células no epiteliales dentro de la lámina propia de la mucosa [321]. La función de la 11β-HSD-1 en este tejido es desconocida. Se ha postulado la presencia de un receptor de alta afinida por 11-dehidrocorticosterona en el colon de rata [322] y en ese caso sería posible que la 11β-HSD modulara la exposición al ligando de dicho receptor.

La actividad de 11β-HSD-2 fue hallada en las glándulas salivares, la piel y las glándulas sudoríparas dónde co-localiza con el receptor de mineralocorticoides [309,323] pero no en las glándulas sebaceas o en la epidermis. La 11β-HSD-1 se expresa en la epidermis donde funciona como una reductasa lo cual concuerda con el efecto tópico que presenta cortisona [324]. Los fibroblastos de piel humana presentan actividad de reductasa *in vitro*, la cuál es incrementada por glucocorticoides e insulina [204].

Tejidos fetoplacentarios

A diferencia de lo que ocurre en la adultez, dónde la relación cortisol/cortisona circulante es de 7:1, la sangre venosa y arterial del cordón umbilical presenta una relación de aproximadamente 1:1. Este relativo incremento en los niveles de cortisona reflejan el alto nivel de expresión de la 11β-HSD-2 en la unidad fetoplacentaria. La 11β-HSD-2 se expresa en los sinciciotrofoblastos de la placenta [228,232,325], donde la actividad se incrementa hacia el final del embarazo en humano, babuino y rata [326-

328]. En contraste, la expresión de la 11β-HSD-2 placentaria se reduce en la placenta de ratón a partir del día 13 de la gestación y continúa baja hasta el término del embarazo [312,329].

La 11β-HSD-1 presenta un nivel de expresión bajo en el tejido trofoblástico, aunque hay evidencia de expresión de actividad de deshidrogenasa $NADP^+$-dependiente en tejido trofoblástico humano, babuino y oveja [327,330,331]. La expresión del gen de la 11β-HSD-1 en la placenta de oveja disminuye a medida que el embarazo llega a término [188]. La 11β-HSD-1, pero no la isoforma 2 de esta enzima, se expresa en el corión y la decidua [325,332,332].

La 11β-HSD-2 también se expresa en diversos tejidos fetales tanto en humano [333,334] como en ratón [329] aunque muchos de estos tejidos no expresan el receptor de mineralocorticoides [335]. La isoforma 1 de la 11β-HSD no se expresa en los tejidos fetales, por lo menos hasta la mitad de la gestación.

El rol de la 11β-HSD en los tejidos placentarios aún no está completamente dilucidado [188]. El alto nivel de actividad de deshidrogenasa en la placenta y el feto, convirtiendo al cortisol en cortisona, sugeriría un importante rol de esta enzima en la protección del feto en desarrollo de un exceso de glucocorticoides [336]. Los glucocorticoides inhiben el crecimiento fetal en humanos, primates y roedores. Existe una correlación inversa entre los niveles de 11β-HSD-2 placentaria y el peso al momento del nacimiento en roedores [337]. Estudios realizados en humanos han demostrado una eficiente inactivación del cortisol en cortisona [338]. Sin embargo, una débil [325] o nula [339] correlación entre la actividad de 11β-HSD-2 en placenta humana y el peso del neonato ha sido observada. Existe una extensa variación en los niveles de actividad de 11β-HSD-2 en la placenta terminal y parecería poco probable que esta variabilidad fisiológica en la actividad enzimática fuese un determinante principal en el crecimiento fetal o el peso del neonato [188]. Sin embargo, debido al renovado interés en el rol del crecimiento fetal en la programación de enfermedades en el adulto como la hipertensión o la diabetes [340,341] ésta es un área en contínuo desarrollo. La nutrición materna podría ser otro factor desencadenante, ya que se ha observado que dietas bajas en proteínas durante la gestación producen una reducción en la actividad de la 11β-HSD-2 placentaria y en el peso del neonato en roedores [188]. Los pacientes con el síndrome de

AME, que presentan una pérdida completa de la actividad de 11β-HSD-2 placentaria, tienen un peso menor al normal en el nacimiento [269,342].

Los embarazos con complicaciones importantes por restricciones en el crecimiento también presentan reducciones en los niveles de actividad de 11β-HSD-2 placentaria [328].

La placenta no expresa receptores de mineralocorticoides [343], y dentro de la placenta misma, la 11β-HSD-2 modularía la expresión de genes blanco de los glucocorticoides como el factor liberador de corticotrofina [332].

En la placenta de babuino la actividad de la 11β-HSD-2 es inducida por estrógenos [344] y se ha postulado que el incremento en la corversión de cortisol en cortisona a medida que el embarazo llega a término facilitaría la maduración del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal [327].

El endometrio de humano y rata expresa ambas isoformas de 11β-HSD [345,346]; la 11β-HSD-2 se localiza en las células epiteliales luminales y glandulares con un rol desconocido. La expresión de la 11β-HSD-1 en el endometrio de oveja es baja en el ciclo estral pero se incrementa en forma notoria en la preñez [347]. La decidualización de las células del estroma endometrial es un proceso fundamental para la implantación y la invasión del trofoblasto. El estradiol y la progesterona inducen, en forma sinergística, la expresión de la 11β-HSD-1 en células del estroma endmetrial en cultivo [348]. Los glucocorticoides regulan las proteasas que degradan la matriz decidual como la colagenasa y el activador del plasminógeno, por lo que la inducción de la expresión de la 11β-HSD-1 en el proceso de decidualización podría ser importante en este sentido.

Mientras que el polipéptido de la 11β-HSD-2 parecería ser el mismo en los tejidos fetales y adultos [229], la 11β-HSD-2 placentaria (determinada en la línea celular JEG-3 de coriocarcinoma humano) sería regulable por cAMP aunque no así la del riñón del adulto [349]. Mediante ensayos de protección a ribonucleasa se ha determinado que el riñón utiliza un sitio de iniciación de la transcripción a 116 bases "río arriba" del codón de iniciación de la traducción mientras que la placenta lo hace a sólo 74 bases. El óxido nítrico inhibe la actividad y la expresión del mRNA de la 11β-HSD-2 en células trofoblásticas humanas [350].

Sistema cardiovascular

Estudios realizados con pacientes con el síndrome de Cushing o medicados con cortisona indican que los glucocorticoides juegan un rol importante en la determinación de la reactividad vascular en el humano, probablemente potenciando el efecto vasoconstrictor de las catecolaminas [351]. Los receptores de mineralocorticoides han sido identificados en aorta de conejo y en la vasculatura mesentérica de rata [352,353]. La carbenexolona y otros inhibidores de la 11β-HSD potencian la vasoconstricción inducida por noradrenalina o angiotensina II [353,354] y aumentan la vasoconstricción reduciendo la relajación dependiente del endotelio [355].

La isoforma 1 de la 11β-HSD se expresa preferencialmente en el sistema vascular, especialmente en el músculo liso vascular [225,356], donde predomina la actividad de reductasa [205]. La actividad de deshidrogenasa se halla reducida en el mesenterio de las ratas Dahl hipertensas sensibles a sal comparada con la cepa resistente a sal [357].

El corazón posee receptores a mineralocorticoides y la aldosterona presenta una acción directa sobre los miocitos cardíacos induciendo fibrosis [358]. Consistente con esto, se ha reportado la presencia de actividad de 11β-HSD-2 en este tejido [359,360].

Gónadas

Actividad de 11β-HSD-2 en niveles apreciables ha sido detectada en ovarios de humanos y roedores. Los glucocorticoides afectan la función ovárica en diversas formas, incluyendo la inhibición de la actividad de aromatasa estimulada por la hormona folículo-estimulante [361], la estimulación de la producción del activador del plasminógeno en las células de granulosa, y la inhibición de la esteroidogénesis inducida por la hormona luteinizante en las células luteales de la granulosa [362]. En los ovarios de humanos y roedores, la 11β-HSD-1 se expresa en el oocito en desarrollo y en las células de la teca, mientras que la 11β-HSD-2 sólo se halla en las células de la granulosa no luteinizadas [300,363-365]. Los pacientes con actividad de 11β-HSD detectable en células de la granulosa la tasa de preñez es cercana a cero comparada con una tasa del 76

% en pacientes sin actividad detectable de 11β-HSD en estas células [366]. Estos estudios fueron realizados antes de que se caracterizaran las isoformas 1 y 2 de la 11β-HSD, por lo que estudios posteriores demostraron sólo la presencia de 11β-HSD-1 en las células de la granulosa luteales. Existe evidencia de que la actividad de deshidrogensa observada en estas células pudiese corresponder a la isoforma 3 de la 11β-HSD dependiente de $NADP^+$ y de alta afinidad [364]. La baja tasa de fertilidad en pacientes con actividad detectable de 11β-HSD en la granulosa junto con la expresión de la 11β-HSD-1 en el oocito indicarían que se requieren altas concentraciones locales de glucocorticoides para la maduración del oocito [188].

Las células de Leydig de rata expresan la isoforma 1 de la 11β-HSD [367,368] pero no la isoforma 2. La inhibición de la actividad de 11β-HSD testicular potencia el efecto inhibitorio de la corticosterona en la secreción de testorsterona [369]. Se requieren nuevos estudios para dilucidar si la actividad observada de deshidrogenasa es debida a la 11β-HSD-1 o a la postulada novel isoforma 3 (11β-HSD-3) [370].

Sistema Nerviso Central

Altos niveles de 11β-HSD $NADP^+$-dependiente han sido detectados en el cerebro, incluyendo al cerebelo, hipotálamo e hipocampo. Estudios de hibridización *in situ* e inmunohistquímica han confirmado la presencia de la 11β-HSD-1 en estas regiones del sistema nerviso [371,372]. En cultivos de neuronas de hipocampo la 11β-HSD-1 funciona predominantemente como una reductasa potenciando los efectos neurotóxicos del glucocorticoide inactivo: la 11-dehidrocorticosterona [206]. En el eje hipotálamico-hipofisario, sin embargo, la inhibicion de la 11β-HSD con ácido glicirretínico modula la retroalimentacion negativa por glucocorticoides reduciendo la concentración de CRF en la sangre portal hipofisaria [373] y alterando el metabolismo cerebral de la glucosa [374], todo lo cuál indicaría la presencia de actividad de deshidrogenasa en estos sitios. Estudios del desarrollo de la hipófisis en oveja avalan las observaciones anteriores [375]. En forma similar, en células de hipófisis GH3 la inhibición de la expresión y actividad de 11β-HSD-1 con derivados del regaliz potencian el efecto inhibitorio de los glucocorticoides en la transcripción del gen de la prolactina [376].

La expresión del mRNA de la 11β-HSD-2 presenta un patrón restringido de expresión dentro del cerebro de la rata, hallándose en el núcleo del tracto solitario, el órgano subcomisural y el hipotálamo [377]. Su rol es desconocido ya que no todas estas regiones expresan el receptor de mineralocorticoides. Estudios de infusiones intracerebroventriculares de inhibidores de la 11β-HSD indican que la 11β-HSD-2 juega un rol importante en la modulación central de la presión sanguínea [378]. Llamativamente, aunque bajas dosis de carbenexolona causan hipertensión, la corticosterona sola no tiene efecto *per se*; sin embargo, antagoniza el efecto hipertensinogénico de la aldosterona [379].

Otros tejidos

La glándula mamaria presenta actividad de 11β-HSD [380], especificamente en las células epiteliales lobulares y ductales donde co-localiza con el receptor de mineralocorticoides [188]. Altos niveles de expresión de 11β-HSD-2 han sido observados en carcinomas invasivos y, si además se tiene en cuenta que, la inhibición de la 11β-HSD-2 potencia las acciones antiproliferativas de los glucocorticoides en ciertas líneas celulares de carcinoma de mama [381] se puede especular que la actividad de 11β-HSD-2 jugaría algún rol etiológico en la patogénesis del carcinoma de mama.

La conversión de cortisol en cortisona ha sido demostrada en el pulmón, en cortes de parénquima de pulmón humano y en cultivos de células epiteliales de tráquea [188]. La 11β-HSD-2 ha sido posteriormente localizada en las células ductales de las glándulas traqueales y bronquiales, en las células alveolares de tipo II y en las células epiteliales ciliadas bronquiales [309], en concordancia con los sitios de expresión del receptor de mineralocorticoides en el pulmón [382]. Análisis por Northern-blot y determinaciones de la actividad de reductasa [383,384] también sugieren la presencia de la 11β-HSD-1, aunque su localización precisa todavia no ha sido estudiada. En el pulmón fetal de rata, los corticosteroides incrementan la actividad de reductasa lo que a su vez lleva a un aumento en la síntesis de surfactantes [384], proceso dependiente de glucocorticoides [385] esencial para la maduración normal del pulmón. Más recientemente, se ha informado de la presencia de inmunoreactividad para 11β-HSD-1 o11β-HSD-2 en la

mucosa olfatoria, la coclea de rata y una serie de tejidos humanos intraoculares [386] [188y sus citas]. Muchos de estos tejidos son conocidos blancos de los mineralo- o gluco- corticoides. La actividad de reductasa ha sido demostrada en los tejidos linfoides de rata, especialmente en el bazo, los nódulos linfáticos, las placas de Peyer y el timo, donde podría estar involucrada en la producción de citoquinas [387].

Una importante expresión de 11β-HSD-1, pero no de 11β-HSD-2, ha sido detectada en el tejido adiposo humano, especificamente en las células estromales adiposas o preadipositos [203]. La actividad es predominantemente de reductasa y es inducida por glucocorticoides. Se ha postulado que la activa conversión de cortisona en cortisol dentro del tejido adiposo omental jugaría un importante rol en la patogénesis de la obesidad central [188]. En las células adiposas estromales, la 11β-HSD-1 también modula la regulación por glucocorticoides de la aromatasa [388].

Por último, en la glándula adrenal de diversas especies hay expresión de ambas isoformas de la 11β-HSD [231,234,300,310,389-394]. Especialmente llamativo es el alto nivel de expresión de la isoforma 2 de esta enzima. En la actualidad se desconoce el rol fisiológico de ambas isoformas de 11β-HSD en la adrenal. Esto último será motivo de estudio del presente trabajo y se discutirá más profundamente en *Resultados y Discusión.*

Objetivos

El objetivo central de la presente Tesis es el estudio de algunos de los mecanismos de regulación de la esteroidogénesis adrenal. A continuación se detallan los objetivos parciales:

A. Estudiar la regulación de la captación de colesterol y de las primeras enzimas involucradas en la biosíntesis de aldosterona mediada por endotelina en la glándula adrenal.

B. Caracterizar la actividad de 11β-HSD en la adrenal de rata y vaca. La importancia de este estudio comparado radica en que mientras la rata es el animal de experimentación fisiológica por excelencia, su camino de biosíntesis de

glucocorticoides es distinto al hallado en bovinos y humanos, entre otros, debido a la ausencia de actividad del citocromo P-450_{c17}.

C. Estudiar el efecto regulatorio de ACTH sobre la actividad de la 11β-HSD en adrenal de rata utilizando para ello modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

D. Estudiar los mecanismo moleculares que llevan la regulación de la actividad de la 11β-HSD tanto en tratamientos agudos como crónicos *in vivo* e *in vitro*.

E. Realizar el clonado, expresión y caracterización de la 11β-HSD-2 bovina con el fin de compararla con su contraparte en otras especies y establecer criterios para el posterior de cultivos primarios de células de fasciculata bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Endotelina-1, $ACTH_{1-24}$, $ACTH_{1-10}$, $ACTH_{11-24}$, medio HAM F-12, seroalbúmina bovina (fracción V, libre de ácidos grasos), PMSF, leupeptina, aprotinina, DNAasa, fosfatasa alcalina (tipo VII-G de mucosa intestinal bovina), PKA (subunidad catalítica de corazón bovino), staurosporina, dibutiril-cAMP, Kemptido, cofactores y los esteroides radioinertes fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). ACTH y ACTH-Gel para los tratamientos *in vivo* fueron obtenidos de Laboratorios Elea (Buenos Aires, Argentina). La colagenasa fue obtenida de Worthington Biochemicals (Freehold, NJ). 2-[1-(3-dimetilaminopropil)-1H-indol-3-il]-3-(1H-indol-3-il)maleimida (B-I) y N-[2-((p-bromocinamil)amino)etil]-5-isoquinolinsulfonamida (H-89) fueron obtenidos de Calbiochem (La Jolla, CA). La aminoglutetimida fue donada por el Dr. Enrique Isola (Ciba Geigy - Argentina). La cianocetona (WIN 19587), inhibidor específico de la enzima 3β–hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ-4-isomerasa, fue generosamente provista por la Dra. Selva Cigorraga (Hospital de Niños "Ricardo Gutierrez", Buenos Aires, Argentina). [1,2-^{3}H(N)]-corticosterona (AE 25-80 Ci/mmol), [1,2-^{3}H(N)]-cortisol (AE 30-80 Ci/mmol), [1,2-^{3}H(N)]-aldosterona (AE 52 Ci/mmol), [1,2-^{3}H(N)]-colesterol (AE 50 Ci/mmol), [6,7-^{3}H(N)]-dexametasona (AE 81 Ci/mmol), [7-^{3}H(N)]-pregnenolona (AE 20 Ci/mmol), [4-^{14}C(N)]-progesterona (AE 50 Ci/mmol), [α-^{32}P]-ATP (AE 30 Ci/mmol) y [γ-^{32}P]-ATP (AE 3000 Ci/mmol) y el reactivo Reinaissance fueron obtenidos de New England Nuclear (Boston, MA). El reactivo Ultraspec RNA fue obtenido de Biotecx (Houston, TX). El kit Micro-Fast Track fue obtenido de Invitrogen (San Diego, CA). La transcriptasa reversa Superscript II, la Taq polimerasa y la lipofecAMINE fueron obtenidas de Gibco BRL (Gaitthersburg, MD). El kit Marathon cDNA Amplification fue obtenido de Clontech (Palo Alto, CA). El sistema de vectores pGEM-T fue obtenido de Promega (Madison, WI). Las enzimas de restricción se obtuvieron de Promega o NEBiolabs. El reactivo BCA para la determinación de proteínas fue obtenido de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Los "primers" fueron sintetizados en el "DNA Core" de la Universitiy of Missouri-Columbia (USA). Los medios de cultivo fueron obtenidos del "Cell Culture Core" de la la Universitiy of Missouri-Columbia (USA). Los anticuerpos contra corticosterona, 11-dehidrocorticosterona, aldosterona y 11β-HSD-2 de rata fueron generosamente provistos por el Dr. C.E. Gomez-Sanchez (Columbia, MO). El anticuerpo anti IgG de

oveja conjugado a peroxidasa y el suero no inmune de oveja fueron obtenidos de Rockland (Gilbertsville , PA). Las células CHOP fueron provistas por el Dr. James W. Dennis (Samuel Lunenefeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, Toronto, Canada). Las placas de TLC de silica gel con indicador fluorescente y los solventes fueron obtenidas de Merck. Las otras drogas utilizadas fueron del mayor grado analítico disponible y de marcas comerciales reconocidas.

Animales y tratamientos *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratas macho CHBB-Thom de 150-250 g de peso provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (UBA). Los animales se mantuvieron en un fotoperíodo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad con libre acceso a comida y agua.

Los órganos bovinos fueron obtenidos de terneras recién faenadas en un matadero local. Para los estudios con células adrenocorticales o fracciones proteicas de las glándulas, éstas fueron transportadas en buffer refrigerado a 4 C conteniendo Tris-HCl 10 mM (pH: 8.0), NaCl 150 mM y glucosa 1 mM. Para los estudios de obtención de RNA los órganos fueron transportados en N_2 líquido.

Infusiones

Las ratas fueron anestesiadas con pentotal sódico (60 mg/Kg, *i.p.*). En primer término se realizó una traqueotomía con el fin de eliminar por esa vía las secreciones producidas durante el período de la anestesia y que puediesen obstruir las vías respiratorias. La traqueotomía se realizó colocando una cánula plástica en la porción inferior de la tráquea sujetándola con hilo de sutura. Las secreciones se aspiraron con una cánula de diámetro inferior a la colocada en la tráquea conectada a una jeringa de 20 ml. Posteriormente se realizó la cateterización utilizando para ello un catéter colocado en la vena yugular a través del cual se infundieron los compuestos estudiados. Con ese fin, se realizó una insición en la región supraclavicular derecha y se accedió a la vena yugular separando el tejido muscular. La vena fue aislada, bloqueada en la parte superior mediante una sutura

y se realizó un corte oblicuo a través del cual se insertó el catéter que fue fijado mediante un nudo a la parte inferior de la vena. Luego del tratamiento quirúrgico los animales se dejaron estabilizar durante 15 min. Las infusiones se realizaron a un flujo de 0.125 ml/min. Se realizó primero una infusion de solución salina (NaCl 0.9 %) durante 15 min y posteriormente se infundieron las drogas ensayadas en solución salina durante otros 30 min adicionales. Las dosis utilizadas fueron: Endotelina-1, Sarafotoxina 6b y Sarafotoxina 6c (80 ng/Kg.min) y $ACTH_{1-24}$ (280 ng/Kg.min). En los casos en que se infudió BQ-123 (200 ng/Kg.min), antagonista de los receptores ET_B, éste se halló presente en los 45 min totales de la infusión. Posteriormente, se extrajeron las adrenales, se colocaron en solución salina fría y se procesaron según los diferentes protocolos.

El flujo de infusión y las dosis utilizadas fueron los valores óptimos informados para el efecto aldosteronogénico de ET-1 [104].

En algunos casos los animales fueron inyectados con aminoglutetimida (60 mg/Kg de peso corporal, *s.c.*) disuelta en NaCl 0.9 %:etanol (1:1) 30 min antes del comienzo de la infusión.

Tratamientos crónicos con ACTH

Las ratas se inyectaron con ACTH (5 UI/día, *i.m.*) y ACTH-Gel (2 UI/día, *i.m.*) a las 0 y 24 hs del tratamiento. Loa animales controles fueron inyectados con NaCl 0.9 % y gelatina 16 % en NaCl 0.9 %. A las 48 hs de tratamiento, los animales fueron sacrificados, se extrajeron las adrenales y se procesaron según los distintos protocolos.

Obtención de las glándulas adrenales y su fraccionamiento

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y/o dislocación cervical, y las glándulas adrenales se extrajeron y colocaron en NaCl 0.9 % a 4 C. Las glándulas adrenales bovinas se obtuvieron y transportaron como se describió anteriormente. En todos los casos los órganos fueron procesados inmediatamente luego de su obtención.

Las glándulas adrenales se limpiaron de tejido adiposo y conectivo, se lavaron con NaCl 0.9 % y según los casos se fraccionaron en las distintas zonas adrenales. Las adrenales de

rata se decapsularon mediante un corte en la cápsula por donde se extruyó la parte central obteniéndose una fracción "capsular" enriquecida en la zona glomerulosa y una fracción denominada "core" enriquecida en la zona fasciculata-reticularis (que además contiene la médula adrenal). Las adrenales bovinas se cortaron en fragmentos de 2.0 cm de lado y las distintas zonas se obtuvieron utilizando un micrótomo manual realizando cortes sucesivos de capas de 0.5 mm de espesor. La capa más externa es la fracción enriquecida en la zona glomerulosa y la segunda capa se tomó como la zona fasciculata-reticularis.

Preparación de células dispersas

Las células dispersas de glomerulosa o fasciculata adrenal de rata o vaca se obtuvieron por disgregación enzimática con colagenasa [91]. Para ello, los trozos del tejido fueron incubados en una solución de colagenasa tipo 1 CLS-1 2 mg/ml, seroalbúmina bovina (BSA) 5 mg/ml y DNAasa 0.2 mg/ml en medio HAM F-12 (suplementado con HEPES 25 mM y con concentraciones finales de $CaCl_2$ 1.8 mM y KCl 4.5 mM) durante 30 min a 37 C en un baño termostatizado con agitación. A los 15 y 30 min del período de incubación el tejido fue disgregado mecánicamente utilizando para ello una jeringa de 20 ml con la que se succionó y expulsó 15 veces la suspensión conteniendo los trozos de tejido.

Los trozos de tejido remanentes después del tratamiento con colagenasa fueron removidos mediante una filtración a través de un tejido de nylon y descartados. Las células se obtuvieron por centrifugación del filtrado a 200 × *g* durante 10 min y luego fueron lavadas dos veces con HAM F-12 conteniendo seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) 0.1 % mediante resuspensión y centrifugación. Las células se resuspendieron en HAM F-12 conteniendo BSA-FAF 0.1 % y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para que las células se recuperarán del "stress" causado durante el tratamiento con colagenasa. Finalmente las células se contaron en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico y se diluyeron en un volumen adecuado para los estudios posteriores. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión de Azul Trypan obteniéndose en todos los casos valores de viabilidad superiores al 90 %.

Incorporación de [^{3}H]-colesterol

Incorporación de [^{3}H]-colesterol *ex vivo*

Las adrenales provenientes de ratas infundidas fueron cortadas en cuartos e incubadas en medio HAM F-12 adicionado con seroalbúmina bovina 1 mg/ml y aminoglutetimida 1 mg/ml durante 15 min a 37 C. Posteriormente se adicionó 100 µl de suero homólogo enriquecido con [^{3}H]-colesterol (1 µCi) y se prosiguió la incubación durante 45 min a 37 C. Las incubaciones fueron detenidas transfiriendo los cuartos de adrenal a tubos conteniendo 1 ml de NaCl 0.9 % y lavándolos tres veces con la misma solución. Se adicionó solución centelladora conteniendo 20 % de Arcopal y la radioactividad asociada a los cuartos de adrenal fue determinada por centelleo líquido.

Incorporación de [^{3}H]-colesterol *in vitro*

10^5 células de glomerulosa adrenal de rata o vaca se incubaron en medio HAM F-12 (suplementado con BSA-FAF 0.2 % y con concentraciones finales de $CaCl_2$ 1.8 mM y KCl 4.5 mM) con aminoglutetimida 1 mg/ml durante 15 min. Posteriormente se adicionó 50 µl de suero homólogo enriquecido con [^{3}H]-colesterol (0.5 µCi) junto con el agente estimulatorio (ET-1 o S6b). La incubación prosiguió otros 60 min y se detuvo centrifugando los tubos a 200 × *g* durante 10 min. Las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación y resuspensión con medio HAM F-12. Se adicionó solución centelladora conteniendo 20 % de Arcopal y la radioactividad asociada a las células fue determinada por centelleo líquido.

En algunos experimentos se adicionó un exceso (4 ×, 200 µl) de suero homólogo no marcado. La diferencia en la incorporación de [^{3}H]-colesterol entre las incubaciones con suero marcado y suero marcado en presencia de un exceso de suero radioinerte fue tomado como incorporación específica de [^{3}H]-colesterol.

Suero enriquecido con [^{3}H]-colesterol

La sangre fue obtenida de ratas normales por punción cardíaca o colectada de la aorta en las terneras. Posteriormente, se incubó durante 3 hs a 37 C y se centrifugó a 2.000 × *g* durante 20 min.El suero se incubó durante toda la noche con [^{3}H]-colesterol a razón de 10 μCi/ml de suero y posteriormente se centrifugó a 4000 × *g* durante 20 min antes de su uso inmediato [395].

Actividad de las primeras enzimas del metabolismo del colesterol

Actividad del citocromo P-450$_{scc}$

Las adrenales se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) conteniendo sacarosa 0,25 M y EDTA 0,5 mM utilizando para ello un homogeinizador de teflón-vidrio.

Alícuotas de los homogenatos (50 μg de proteína) se incubaron en buffer de incubación (pH 7.4) conteniendo K_2HPO_4 10 mM, KCl 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM, trietanolamina 15 mM, sacarosa 0.25 M y cianocetona 10 μM en un volumen final de 0.6 ml durante 15 min a 37 C. Posteriormente, se adicionó ácido málico y NADPH (concentraciones finales de 10 y 0.5 mM respectivamente) y [^{3}H]-colesterol (0.5 μCi en 200 μl de buffer de incubación conteniendo 50 μl de propilenglicol). El volumen final de incubación fue de 1 ml y las incubaciones se realizaron durante 15 min (rango lineal) a 37 C. Las reacciones fueron detenidas colocando los tubos en un baño de hielo-agua. Luego se agregó [^{14}C]-pregnenolona (5.000 dpm) para determinar la recuperación y pregnenolona radioinerte. El medio de incubación fue extraído con 5 ml de cloruro de metileno. El extracto orgánico fue evaporado bajo un flujo de N_2 y el residuo seco particionado en 1 ml de heptano con 1 ml de etanol:agua (8:2) [396]. La fase superior enriquecida en heptano fue desechada. La fase etanólica fue lavada con 1 ml de heptano, evaporada bajo N_2 y el residuo seco reconstituido en cloruro de metileno. Los extractos orgánicos luego se sembraron en placas de cromatografía en placa delgada (TLC) de silica gel que se desarrollaron con ciclohexano:acetato de etilo (3:2) como fase móvil. La posición de la

pregnenolona fue revelada colocando las placas en una cámara saturada de vapores de iodo. La silica de la zona correspondiente a la pregnenolona fue raspada de la placa y la radiactividad asociada determinada por centelleo líquido.

Validación del método de determinación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$

El ensayo de determinación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ se validó según los criterios que se explican posteriormente en la sección I de *Resultados y Discusión*. Para ello, una alícuota del homogenato (1.28 mg de proteína) de adrenales de rata o de la fracción mitocondrial (0.290 mg de proteína) se incubaron como se describe más arriba para la determinación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ con las siguientes modificaciones. La incubación con cianocetona se prolongó por 20 min a 37 C y la posterior incubación con [^{3}H]-colesterol se realizó durante 60 min a 37 C. Finalizada la incubación, la fase acuosa se extrajo dos veces con 2.5 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se llevó a sequedad bajo una corriente se N_2 y posteriormente se particionó con 1.0 ml de heptano y 1.0 ml de solución de etanol:agua (8:2). La fase etanólica se lavó con 1.0 ml de heptano y se secó bajo corriente de N_2. El residuo seco se resuspendió en 0.5 ml de agua, se extrajo dos veces con 2.5 ml de cloruro de metileno y finalmente la fase orgánica se llevó a sequedad. Las muestras se resuspendieron en 50 µl de etanol, de los cuales 20 µl fueron analizados por HPLC. Para ello se utilizó una columna de fase reversa C-18 (25 cm largo, 4.6 mm diámetro interno, 5 µm diámetro particulas relleno, Supelco). La fase móvil utilizada fue metanol:agua (8:2) con un flujo de 0.8 ml/min. Se recogieron muestras cada 1 min, las cuales se llevaron a sequedad bajo una corriente de aire, se adicionó solución centelladora con 5 % de etanol y se determinó la radiactividad de ^{3}H y ^{14}C mediante centelleo líquido.

Validación de la partición con heptano y etanol:agua (8:2)

Para validar el médodo de partición utilizado en la determinación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ se realizaron ensayos de partición en condiciones similares a las

utilizadas posteriormente con muestras, pero conteniendo cantidades conocidas de [^{3}H]-colesterol o [^{3}H]-pregnenolona.

Una alícuota de 0.1 ml de cloruro de metileno:metanol (9:1) conteniendo 7.000 dpm de [^{3}H]-colesterol o 12.000 dpm de [^{3}H]-pregnenolona, por triplicado, se llevaron a sequedad bajo corriente de N_2. El residuo seco se resuspendió en 1.0 ml de heptano y 1.0

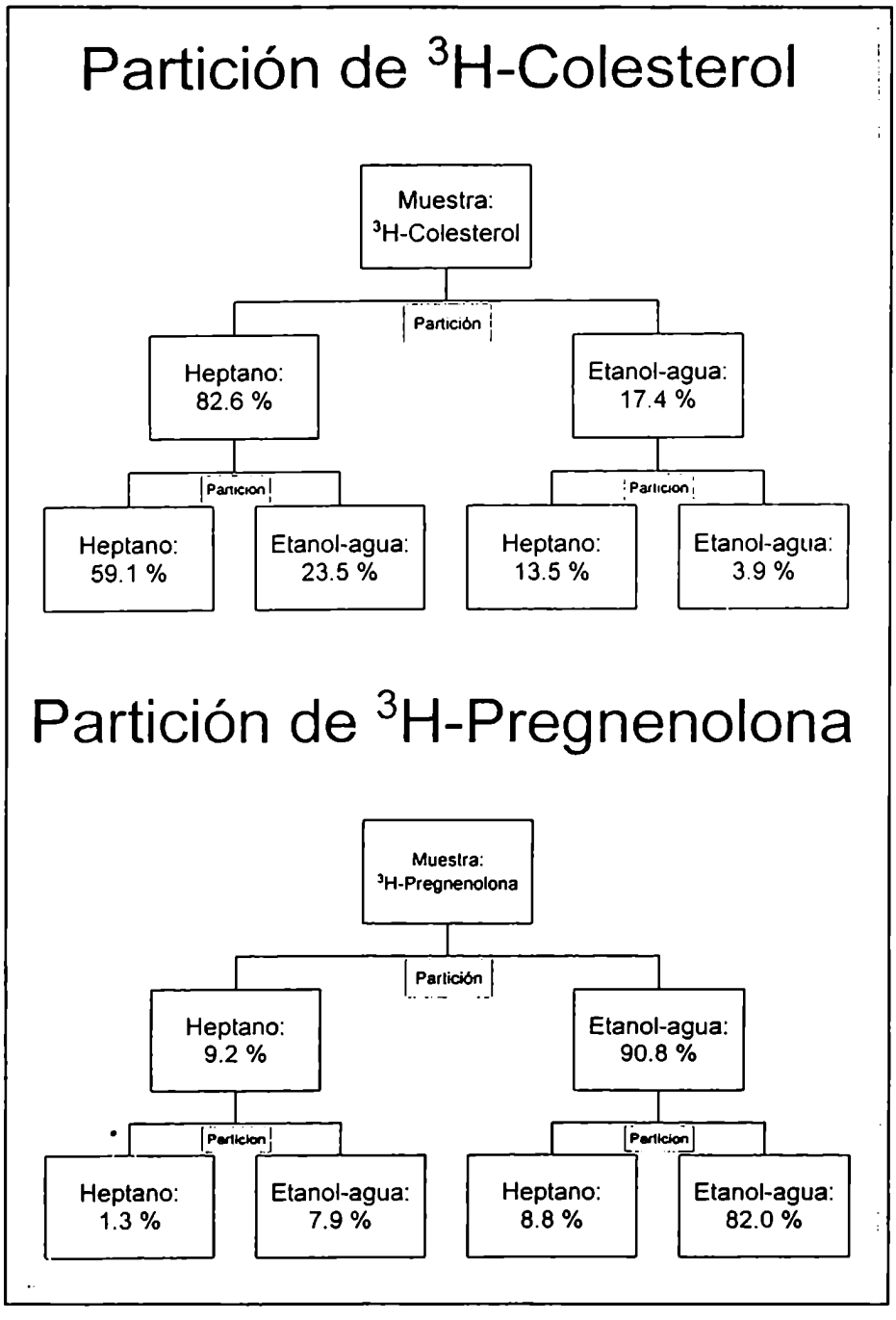


Fig. 2.1. Validación de la partición con heptano y etanol:agua (8:2).

ml de solución de etanol:agua (8:2). Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1.000 × *g* durante 5 min. Las fases se separaron y de cada una de ellas se reservó 0.5 ml para la posterior determinación de la radiactividad. El resto de cada fase fue extraída nuevamente con 0.5 ml de la fase contraria correspondiente y se repitió el proceso arriba mencionado. Las alícuotas correspondientes a cada fase fueron llevadas a sequedad, se les adicionó solución centelladora con 5 % de etanol y se determinó la radiactividad asociada por centelleo líquido.

En la Fig. 2.1 se observa que en la primer partición en la fase etanol:agua se recupera el 90.8 % de la pregnenolona y sólo el 17.4 % del colesterol. Cuando esta fase es lavada con heptano, en la fase etanol:agua de la segunda partición se recupera el 82.0 % de la pregnenolona original mientras que en esta fase sólo permanece el 3.9 % del colesterol original. Por lo tanto, esta partición permite eliminar gran parte del [^{3}H]-colesterol, lo que facilita la posterior separación de colesterol-pregnenolona en la cromatografía en capa delgada.

Actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ5 isomerasa

Las adrenales fueron homogeneizadas en buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) contenidendo EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 0.4 mM y sacarosa 0.25 M.

Una alícuota del homogento (10 µg de proteína) se incubó en el buffer antes mencionado conteniendo NAD^+ 1 mM y [^{3}H]-pregnenolona (AE 2000 dpm/nmol) 50 µM en un volumen final de 1 ml. La incubación se realizó durante 10 min a 37 C y fue detenida por el agregado de 5 ml de cloruro de metileno. Posteriormente, se adicionó [^{14}C]-progesterona (5.000 dpm) y progesterona radioinerte (5 µg) como marcador de pérdidas y "carrier" respectivamente. El extracto orgánico fue evaporado bajo corriente de N_2, y el residuo seco reconstituido en cloruro de metileno y sembrado en placas de TLC de silica gel que se desarrollaron con benceno:etanol (95:5) como fase móvil. La posición de la mancha de progesterona fue revelada observando la placa con luz UV. La silica correspondiente a la zona de la progesterona fue raspada de la placa y la radiactividad asociada determinada mediante centelleo líquido.

Determinación de aldosterona, corticosterona y 11-dehidrocorticosterona

La determinación de las concentraciones de esteroides radioinertes biosintetizados se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA).

Preparación de las muestras.

Para la determinación de las concentraciones intraadrenales de esteroides, las glándulas adrenales de rata o sus fracciones fueron homogeneizadas en solución de NaCl 0.9 % o en el buffer adecuado, en una proporción de 2 adrenales/ml de medio. Los homogenatos se centrifugaron a 6.000 × *g* durante 20 min y las determinaciones se realizaron en el sobrenadante.

En las incubaciones con células dispersas, los incubados se centrifugaron a 6.000 × *g* durante 20 min y las determinaciones se realizaron en el sobrenadante. Este tratamiento produce ruptura celular por lo que se determina el contenido total, tanto intra como extracelular.

Para la determinación de corticosterona sérica, las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca se incubaron durante 2 hs a 37 C para la obtención del suero. Las muestras se centrifugaron a 2.000 × *g* durante 10 min y se guardó el sobrenadante que se utilizó como la fracción sérica.

Radioinmunoensayo (RIA)

El protocolo general consistió en la incubación de 10 µl de muestra o stándares y 200 µl de buffer borato 0.1 M (pH 8.0) conteniendo seroalbúmina bovina 0.1 %, γ-globulina bovina 0.2 %, 5.000 dpm de [^{3}H]-esteroide y el anticuerpo específico en la dilución adecuada.

Las muestras y los stándares se diluyeron, cuando fue necesario, en buffer borato 0.1 M (pH 8.0) conteniendo 5 % de etanol.

Los tubos se incubaron a 4 C durante 14-20 hs. La reacción se finalizó mediante el agregado de 0.2 ml de solución fría de $(NH_4)_2SO_4$ al 75 % de saturación. Inmediatamente los tubos se centrifugaron a 6.000 x *g* durante 20 min a 4 C, obteniéndose un pellet conteniendo el complejo anticuerpo-esteroide. El sobrenadante, conteniendo el esteroide no unido al anticuerpo, se volcó en un vial para la determinación de la radiactividad asociada a esta fracción. Para ello, se le adicionó 3.0 ml de solución centelladora, se agitó vigorosamente, se dejó estabilizar durante 24 hs a 4 C, y finalmente se determinó la radiactividad por centelleo líquido.

La unión inespecífica se realizó indistintamente con un exceso de 100 veces del esteroide radioinerte del tubo más concentrado de la curva de calibración o en ausencia de anticuerpo específico.

Para la puesta a punto de las condiciones de cada uno de los RIAs se determinó la dilución óptima del anticuerpo utilizado y el rango de la curva de calibración. Para la determinación de la dilución óptima del anticuerpo se realizaron diluciones seriadas del mismo, las cuales se incubaron como se describió anteriormente con una cantidad fija de [^{3}H]-esteroide como trazador. Luego del ensayo de la determinación de la radiactividad asociada al complejo trazador-anticuerpo se graficaron curvas de % de trazador unido vs. dilución de anticuerpo con lo que se obtuvo la concentración de anticuerpo que une el 50 % del trazador adicionado para cada caso. Esa fue la dilución de trabajo utilizada en cada RIA para cada anticuerpo.

Una vez obtenida la dilución de trabajo de cada anticuerpo se realizaron curvas con concentraciones crecientes de esteroides radioinertes como standard entre 1 y 10.000 pg/tubo. Posteriormente, se graficaron curvas de % de trazador unido vs. masa de standard y se determinó el rango óptimo para la curva de calibración.

A continuación se detallan las características específicas de los anticuerpos utilizados en cada caso, su dilución de trabajo y el rango de la curva de calibración:

Aldosterona: Se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de un hibridoma de ratón [397]. La dilución de trabajo fue de 1/7.000. La curva de calibración abarcó un rango entre 1 y 100 pg/tubo.

Corticosterona: Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en oveja. La dilución de trabajo fue de 1/4.000 La curva de calibración abarcó un rango entre 10 y 1.000 pg/tubo.

11-Dehidrocorticosterona: Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en oveja. La dilución de trabajo fue de 1/70.000 La curva de calibración abarcó un rango entre 1 y 100 pg/tubo.

Todos los anticuerpos utilizados fueron provistos por el Dr. C.E. Gomez-Sanchez.

Los valores obtenidos de radiactividad asociada a la fracción de trazador no unida al anticuerpo y los valores de masa de esteroide radioinerte adicionada a los tubos estándares fueron ajustados a una curva logística de 4 parámetros utilizando el programa PC/RIA versión 2.0 (International Atomic Energy Agency, Viena, 1989).

En la determinación de los niveles de corticosterona sérica el mayor inconveniente radica en la existencia en esa fracción de la proteína ligadora de corticosteroides (CBG) que uniría en el RIA al trazador subestimando así la concentración del esteroide. Para evitar esto, las muestras deben ser sometidas a un tratamiento para inactivar o remover esta proteína. En este trabajo se utilizó un método de desnaturalización de la CBG mediante tratamiento con solventes [398]. Con este fin, una alícuota de 10 µl de muestra o stándares se desnaturalizaron por el agregado de 0.1 ml de metanol. El solvente se evaporó durante toda la noche a temperatura ambiente y se procedió al RIA como se describió anteriormente.

11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Obtención de homogenatos y fraccionamiento subcelular

Las adrenales enteras de rata o las zonas fraccionadas (cápsula y "core") se resuspendieron en buffer de homogeinización frío (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, sacarosa 0.25 M, pH 8.0) y se homogeneizaron con un Potter de teflón-vidrio. Las capas de adrenal bovina fueron cortadas en pequeños trozos y homogeneizadas en un homogeinizador de cuchillas.

Las organelas fueron aisladas por centrifugación diferencial. Brevemente, el lisado se centrifugó a 680 × *g* durante 10 min a 4 C y se obtuvo un pellet conteniendo la fracción nuclear. El sobrenadante fue luego centrifugado a 9000 × *g* durante 10 min para obtener la fracción mitocondrial en el pellet. Este último sobrenadante fue centrifugado a 200.000 × *g* durante 35 min para obtener la fracción microsomal y el sobrenadante resultante fue

utilizado como la fracción soluble. Los pellets fueron reconstituidos en el buffer de homogeinización. Los núcleos fueron posteriormente purificados de acuerdo a un protocolo de dos pasos [399]. La fracción nuclear fue centrifugada a 70.000 × *g* durante 70 min utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa de 0.25/2.4 M de sacarosa en HEPES 10 mM (pH 7.5) y este pellet fue centrifugado nuevamente sobre un colchón de sacarosa 2.2 M en HEPES 10 mM (pH 7.5) a 70.000 × *g* durante 60 min. Como marcadores de la fracción mitocondrial y microsomal se determinaron las actividades enzimáticas de succinato deshidrogenasa [400] y glucosa 6 fosfatasa [401] respectivamente.

Determinación de la actividad enzimática 11β–HSD

Para la determinación de la actividad de deshidrogenasa de ambas isoformas de la 11β-HSD, se realizaron incubaciones con la fracción proteica adecuada, [^{3}H]-esteroides 11-reducidos y NAD^+ o $NADP^+$ como cofactores. Posteriormente, los esteroides se extrajeron, separaron y cuantificaron. A continuación se detalla el protocolo general y sus variantes.

Entre 1-100 μg de proteína se incubaron con 200.000 dpm de [^{3}H]-esteroides 11-reducidos ([^{3}H]-corticosterona , [^{3}H]-cortisol o [^{3}H]-dexametasona) en buffer de incubación (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8.0) conteniendo NAD^+ o $NADP^+$ 0.5 mM en un volumen final de 0.5 ml durante 15 min a 37 C. Las incubaciones fueron terminadas colocando los tubos en una baño de agua-hielo. Se adicionó 5 ml de cloruro de metileno y 20 μg del correspondiente sustrato y producto radioinerte como marcadores (ver Tabla 2.1), y los esteroides fueron extraídos en la fase orgánica. Los extractos orgánicos fueron llevados a sequedad con N_2 y los esteroides separados por TLC en placas de sílica gel utilizando el solvente de corrida adecuado (ver Tabla 2.1). Las áreas correspondientes a los esteroides (sustrato y producto) fueron localizadas bajo la luz UV, raspadas y la radioactividad asociada a cada una se determinó por centelleo líquido.

Tabla 2.1: Solventes de corrida utilizados para la cromatografía en capa delgada en la determinación de la actividad de 11β-HSD

Par de esteroides (esteroide 11-reducido/11-oxidado)	Solvente de corrida utilizado
corticosterona/11-dehidrocorticosterona	acetona:cloruro de metileno (18:82)
cortisol/cortisona	acetona:cloruro de metileno (30:70)
dexametasona/11-dehidrodexametasona	acetona:cloroformo (25:75)

Para la determinación de la actividad de reductasa (reacción inversa), el protocolo fue similar al detallado salvo que se utilizó como sustrato [^{3}H]-esteroides 11-oxidados ([^{3}H]-11-dehidrocorticosterona, [^{3}H]-cortisona o [^{3}H]-11-dehidrodexametasona) y NADH o NADPH como cofactores. Las incubaciones y procesamiento de las muestras fue realizado como se indicó anteriormente para la actividad de deshidrogenasa.

En los estudios de inhibición se adicionaron también cantidades crecientes de los compuestos ensayados, los cuales se agregaron conjuntamente con el sustrato radiactivo.

Los esteroides (corticosterona, cortisol, dexametasona, 11-dehidrocorticosterona, cortisona, 11αOH-progesterona y 11βOH-progesterona) se disolvieron en etanol absoluto y las diluciones de estos se realizaron con buffer de incubación. La concentración de etanol nunca superó la concentración de 0.1 % final. Staurosporina, H-89 y B-I se disolvieron en DMSO y las diluciones se realizaron en el mismo solvente. La concentración final de DMSO nunca fue superior al 1.0 %. Los ensayos realizados indicaron que esas concentraciones de solventes (Etanol y DMSO) no modifican la actividad de ambas isoformas de 11β-HSD. La carbenexolona, db-cAMP, $ACTH_{1-24}$ se disolvieron en agua destilada y las diluciones se realizaron con buffer de incubación.

Para las determinaciones de los parámetros cinéticos (K_m y $V_{máx}$) se realizaron incubaciones con concentraciones crecientes de sustratos radioinertes y concentraciones saturantes de cofactores (0.5 mM). Los datos fueron posteriormente ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal utilizando para ello el programa HYPER.EXE (version 1.1s, 1996) realizado por J. S. Easterby.

Tratamiento con fosfatasa alcalina-Actividad de 11β-HSD

Las adrenales de ratas normales o inyectadas previamente con ACTH (5 UI, *s.c.*) 30 min antes del sacrificio se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) conteniendo $MgCl_2$ 1 mM, sacarosa 0.25 M, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml y PMSF 1 mM, y se obtuvo la fracción microsomal como se detalló anteriormente. Veinte microgramos de proteína microsomal de adrenal de rata se incubaron con 1.85 U de fosfatasa alcalina tipo VII-G de mucosa intestinal bovina en un volumen final de 0.1 ml durante 15 min a 37 C. Como control se realizaron incubaciones a 0 C en un baño de hielo-agua durante el mismo período. La reacción se detuvo por el agregado de 10 µl de EDTA 50 mM. Para la determinación de la actividad de 11β-HSD-2 se adicionó NAD^+ a una concentración final de 0.5 mM, 200.000 dpm de [^{3}H]-corticosterona y se completó a un volumen final de 0.5 ml con el buffer utilizado para la homogeinización sin sacarosa. La incubación se realizó a 37 C durante 15 min y los tubos se procesaron como se indicó anteriormente para la determinación de la actividad de 11β-HSD.

Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina

La determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina se realizó utilizando el kit para análisis manual de Fosfatasa Alcalina Optimizado de Boehringer Mannheim según el protocolo de punto final. Para ello, 20 µl de muestra se incubaron con 1 ml de buffer dietanolamina 1 M (pH 9.8) (o el buffer ensayado) conteniendo $MgCl_2$ 0.5 mM y *p*-nitrofenilfosfato sódico 10 mM a 37 C durante 10 min. La reacción se detuvo por el agregado de 5.0 ml de NaOH 0.4 N. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm y la concentración se calculó como FA (U/l)= 1627 * $Abs._{405}$.

Tratamiento con PKA-Actividad de 11β-HSD

Para la determinación del efecto del tratamiento con PKA sobre la actividad de la 11β-HSD, se pretrataron microsomas de adrenal de rata con la subunidad catalítica de la PKA y luego se determinó la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β-HSD.

Veinticinco microgramos de proteína microsomal de adrenal de rata se incubaron con 1 U de la subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), $MgCl_2$ 10 mM, ATP 100 µM en un volumen final de 70 µl. Cuando se adicionó H-89 (concentración final 1 µM) disuelto en DMSO, la concentración final del solvente fue de 0.5 %; los controles realizados en presencia y ausencia de esta conconcentración final de DMSO mostraron que en esta concentración no afecta a la actividad de la PKA. La incubación se realizó a 30 C durante 15 min y se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo-agua. Para la determinación de la actividad de 11β-HSD se adicionó NAD^+ o $NADP^+$ a una concentración final de 0.5 mM, 200.000 dpm de [^{3}H]-corticosterona y se completó a un volumen final de 0.5 ml con buffer de incubación. La incubación se realizó a 37 C durante 15 min y los tubos se procesaron como se indicó anteriormente para la determinación de la actividad de 11β-HSD.

Determinación de la actividad de PKA

Una alícuota proteica se incubó en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) conteniendo $MgCl_2$ 10 mM, Kemptido 50 µM, ATP 100 µM y 4×10^6 dpm de [γ-^{32}P]-ATP en un volumen final de 70 µl. La incubación se realizó a 30 C durante 15 min. La reacción se detuvo sembrando 40 µl de la mezcla de reacción en un papel de fosfocelulosa de 2×2 cm de lado. Los papeles se lavaron por inmersión tres veces en solución de ácido fosfórico 75 mM durante 5 min con agitación y una vez en etanol 96 %. Finalmente, los papeles se secaron y se determinó la radiactividad asociada por centelleo líquido.

Fosforilación in vitro *con PKA -Inmunoprecipitación*

Para determinar si la PKA es capaz de fosforilar a la 11β-HSD-2 *in vitro*, se realizó la fosforilación de microsomas de adrenal de rata con la subunidad catalítica de la PKA y [γ-^{32}P]-ATP. Posteriormente se realizó una inmunoprecipitación y los péptidos fueron analizados por SDS-PAGE.

Veinticinco microgramos de proteína microsomal de adrenal de rata se incubaron con 2 U de la subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino en buffer Tris-HCl 50 mM

(pH 7.5), $MgCl_2$ 10 mM, ATP 100 µM y 5×10^7 dpm de [γ-^{32}P]-ATP en un volumen final de 70 µl. La incubación se realizó a 30 C durante 15 min y se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo-agua.

Para solubilizar las proteínas para la inmunoprecipitación se adicionó a cada tubo 0.2 ml de buffer de lisis conteniendo: buffer PBS (fosfato de sodio 9.5 mM, NaCl 145 mM, pH 7.4) adicionado con Nonidet P-40 1 %, SDS 0.1 %, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, fluoruro de sodio 100 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y pirofosfato de sodio 10 mM. Los tubos se incubaron durante 30 min en hielo. Para la inmunoprecipitación, se adicionó 0.5 µl del anticuerpo policlonal anti-11β-HSD-2 de rata obtenido en oveja y se incubó durante 60 min en hielo. Posteriormente, se adicionó 20 µl de proteína G-sepharosa diluida 1:2 en buffer de lisis y los tubos se incubaron durante 16 hs a 4 C con rotación constante. Los complejos antígeno-anticuerpo se separarón del resto de las proteínas no precipitadas por centrifugación a 10.000 × g durante 20 min y posteriormente se lavaron 3 veces con 0.5 ml de buffer de lisis frío sin los inhibidores de fosfatasas.

Los tubos que no se inmuprecipitaron luego de la reacción de fosforilación *in vitro* y la solubilización de las proteínas en buffer de lisis, se precipitaron agregando 0.2 ml de acetona fría, se incubaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 10.000 × *g* durante 5 min. Los precipitados se lavaron 2 veces con 0.25 ml de una mezcla de acetona:agua (1:1) para eliminar el exceso de [γ-^{32}P]-ATP no incorporado.

Finalmente, a los inmunoprecipitados y los precipitados acetónicos se les adicionó 40 µl de buffer de siembra y se incubó 10 min a 95 C para preparar las muestras para el análisis por SDS-PAGE.

Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como se detalla en "Western-blot". La membrana se expuso a una película radiográfica Biomax MS-1 en un cassette con pantalla intensificadora a -70 C durante tiempos variables entre 1 y 7 días. Las autoradiografías se revelaron según técnicas convencionales de revelado. Por último la membrana se reveló según la técnica de Western con el mismo anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación como se detalla en "Western-blot".

Marcación por fotoafinidad de la 11β-HSD-2

El marcado por fotoafinidad de la 11β-HSD-2 se realizó según la técnica descripta por Brown R.W. *et al.* [229]. Trescientos microgramos de proteína microsomal adrenal de rata o vaca fueron incubados en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) conteniendo $MgCl_2$ 1 mM, NAD^+ 2.5 mM, ditiotreitol (DTT) 25 mM y 1 μCi de [^{3}H]-corticosterona en un volumen final de 0.5 ml. Las incubaciones se realizaron en placas de 24 pocillos. La incubación se realizó a 37 C bajo luz UV (312 nm, 5 cm debajo de un transiluminador) durante 15 min. Posteriormente, las muestras se precipitaron adicionando 0.5 ml de acetona a -20 C y los tubos se incubaron a -20 C durante 30 min. Los tubos se centrifugaron a 10.000 × *g* durante 10 min a 4 C. El sobrenadante se guardó para determinar la actividad de 11β-HSD; para ello se llevó a sequedad bajo corriente de N_2, se agregó 0.5 ml de agua y 5 ml de cloruro de metileno y se procesó como se describió anteriormente. El pellet se lavó dos veces por resuspensión y centrifugación con solución de acetona:agua (1:1). El pellet final se resuspendió en 40 μl de agua destilada. Cinco microlitros de cada muestra se analizaron por SDS-PAGE y luego el gel fue sometido a fluorografía.

Fluorografía

Se utilizó la técnica de impregnación del gel con PPO (2,5-difeniloxazol) disuelto en ácido acético, descripto por Skinner M.K. y Griswold M.D. [402]. El gel se sumerge sucesivamente en ácido acético sin diluir durante 5 min y posteriormente en una solución de PPO 20 % (p/v) en ácido acético sin diluir durante 1.5 hs con agitación constante. Luego se sumerge al gel en agua destilada durante 30 min para producir el precipitado del PPO. Finalmente, el gel se seca mediante vacio y calor sobre un papel de filtro, y se expone a una película radiográfica X-OMAT (Kodak) durante 30 días a -70 C.

Incubaciones con células dispersas

Las células de fasciculata adrenal de rata fueron utilizadas para la determinación tanto de la biosíntesis de esteroides como de la actividad de 11β-HSD. El protocolo fue similar con la

única excepción que las células utilizadas para la medición de la actividad de 11β-HSD sufrieron un pretratamiento con cianocetona 10 μM durante 30 min para inhibir la biosíntesis de esteroides y así evitar que las diferencias de concentración de éstos entre los tratamientos interfiriera en la medición de la actividad de 11β-HSD.

Para la determinación de la actividad de 11β-HSD, 10^4 células de fasciculata adrenal de rata fueron incubadas en medio HAM F-12 adicionado con HEPES 25 mM , cianocetona 10 μM (concentración final de etanol 0.1 %) y con concentraciones finales de $CaCl_2$ 1.8 mM y KCl 4.5 mM en un volumen final de 0.5 ml. La incubación se realizó a 37 C durante 30 min en un baño termostatizado con agitación como en todos los pasos posteriores. Luego las células fueron tratadas con los distintos agentes, adicionados en un volumen que nunca excedió a 10 μl, durante 60 min a 37 C. Finalmente se adicionó 200.000 dpm de [^{3}H]-corticosterona en 0.1 ml de HAM F-12 y la incubación se prosiguió durante 15 min a 37 C. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo-agua. Posteriormente, se realizó la extracción, separación y cuantificación de los esteroides como se detalló anteriormente para la determinación de la actividad de 11β-HSD.

Cuando se utilizaron agentes inhibidores de proteínas kinasas, estos se hallaron presentes desde el comienzo de la preincubación con cianocetona, o sea, 30 min antes del agregado de los otros agentes.

Para la determinación de la biosíntesis de esteroides, 10^4 células de fasciculata adrenal de rata se incubaron en HAM F-12 (adicionado con HEPES 25 mM y con concentraciones finales de $CaCl_2$ 1.8 mM y KCl 4.5 mM) conteniendo los agentes indicados en cada caso. El volumen final de incubación fue de 0.5 ml, la cual se realizó a 37 C durante 60 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 6.000 × *g* durante 20 min y los sobrenadantes se reservaron para la determinación de esteroides.

En los casos en que luego del tratamiento con los agentes se prepararon microsomas para la determinación de la actividad de la 11β-HSD en ellos, las incubaciones fueron realizadas como se detalló anteriormente con la modificación de que la concentración celular fue de 10^5 células/ml.

$ACTH_{1-24}$, $ACTH_{1-10}$, $ACTH_{11-24}$ y db-cAMP se disolvieron en agua destilada. Staurosporina, H-89, B-I se disolvieron en DMSO. En estos casos la concentración final de

DMSO fue de 1.0 % y se realizaron los respectivos controles en presencia de idénticas concentraciones de DMSO.

Extracción de RNA total y mRNA

El RNA total fue extraído utilizando el reactivo Ultraspec RNA (Biotecx) utilizando una realción de 1 ml de reactivo cada 100 mg de tejido según el protocolo provisto por el fabricante. El método se basa en el uso de solución 14 M de tiocianato de guanidinio y urea como agentes desnaturalizantes. La concentración del RNA total fue cuantificada por espectrofotometría.

El mRNA fue aislado usando el kit Micro-Fast Track (Invitrogen), basado en la absorción del mRNA a oligo (dT)-celulosa, según el protocolo provisto por el fabricante.

Northern-blot 11β-HSD-2

La determinación de los niveles endógenos de mRNA de 11β-HSD fueron cuantificados mediante la técnica de Northern-blot, utilizándo para ello el kit Northern-Max Gly (Ambion).

Treinta microgramos de RNA total fueron tratados con glioxal-DMSO y separados por electroforesis en un gel de agarosa 1%. El RNA fue luego transferido a una membrana de nylon Zeta Probe (BioRad) mediante transferencia capilar alcalina ascendente [403] y fijado mediante horneado a 80 C durante 30 min.

La membrana se observó en un transiluminador, donde se determinó la posición de las bandas de los RNA ribosomales de 28S y 18S. La hibridización se realizó en un volumen de 2.5 ml de buffer de hibridización (0.1 ml/cm^2 de membrana) a 50 C para 11β-HSD-2 y a 42 C o 50 C para 11β-HSD-1. Se dejó hibridando toda la noche, y las membranas se lavaron dos veces con 0.1 ml/cm^2 de membrana de buffer de baja rigurosidad a temperatura ambiente durante 5 min y dos veces con 0.1 ml/cm^2 de membrana de buffer de alta rigurosidad a la misma temperatura que la hibridización durante 15 min. Luego

las membranas fueron expuestas a películas radiográficas durante tiempos variables entre 2 y 30 días y luego reveladas.

Obtención de las sondas

Los plásmidos conteniendo los insertos de las regiones codificantes de ambas isoformas de la 11β-HSD de rata fueron cedidos por el Dr. C.E. Gomez-Sanchez. Los plásmidos fueron utilizados para transformar bacterias competentes que se crecieron en medio LB con 100 μg/ml de ampicilina durante toda la noche. Las bacterias se cosecharon por centifugación (6.000 × *g* por 20 min) y los plásmidos fueron purificados con el kit GeniePrep (Ambion), basado en lisis celular alcalina y purificación del DNA por absorción a fibra de vidrio. Los plásmidos obtenidos se chequeron por mapeo de restricción; para ello 20 μl del plásmido obtendido se incubaron con 2 U de las enzimas de restricción: Eco RI para 11β-HSD-1 y Hind III/Xho I para 11β-HSD-2 durante 60 min a 37 C y luego fueron analizados en un gel de agarosa 1.2 %. Se obtuvieron bandas de los PM esperados. Para la obtención de las sondas, se purificaron los plásmidos, se trataron en forma similar a lo antes mencionado y los fragmento específicos se purificaron mediante un gel de agarosa de bajo punto de fusión y extracción de ésta utilizando las columnas del kit GeniePrep. La marcación de la sonda se realizó mediante la técnica de marcado al azar ("random primer labeling") utilizando el kit DecaPrime 2 (Ambion), basado en el uso de decámeros al azar y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa carente de actividad exonucleasa, según el protocolo provisto por el fabricante.

Electroforesis en geles de poliacrilamida/Western-blot 11β-HSD-2

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) fueron realizados según la técnica de Laemmli U.K. [404] en minigeles utilizando la cuba Mini-PROTEAN II (BioRad). Las muestras se adicionaron con Nonidet P-40 y SDS (concentraciones finales: 1.0 % y 0.1 % respectivamente) y se incubaron durante 30 min

en hielo. Posteriormente, se agregó por lo menos 3 volúmenes de buffer de siembra conteniendo Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), glicerol 10.0 %, SDS 2.0 %, β-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.05 %. Los geles de poliacrilamida se realizaron con una concentración final de monómero de 12.0 % y se corrieron a voltaje constante de 160 V.

La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó según la técnica húmeda utilizando el módulo mini Trans-Blot (BioRad) en la cuba antes mencionada. Las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (poro: 0.45 μm) utilizando buffer Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v). La transferencia se llevó a cabo durante 60 min a un voltaje constante de 100 V.

La eficiencia de la transferencia se evaluó tiñiendo la membrana con una solución de rojo Ponceau S 0.2 % en ácido acético 1.0 % durante 2 min y luego destiñiendo varias veces con agua destilada.

Los geles se tiñieron con solución de Coomassie Blue R-250 0.1 % en metanol 50 % y ácido acético 10 % durante 15 min a temperatura ambiente. Para remover el exceso de colorante los geles se colocaron en un recipiente con un exceso de agua destilada (200 veces el volumen del gel) y se calentó en un horno de microondas durante 15 min a máxima potencia [405].

Para el revelado inmunológico mediante la técnica de Western-blot, la membrana transferida se bloqueó en PBS-T (fosfato de sodio 9.5 mM (pH 7.4), NaCl 145 mM, Tween-20 0.05 %) con leche descremada 5 % (p/v) durante toda la noche a 4 C. Luego se lavó dos veces con PBS-T y se incubó con el anticuerpo anti-11β-HSD-2 de rata (provisto por el Dr. C.E. Gomez-Sanchez) diluido 1:10.000 en PBS-T conteniendo seroalbúmina bovina 1.0 %. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 60 min con agitación y luego se lavó con PBS-T 1 vez durante 15 min y 4 veces durante 5 min. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-especie (anti IgG de oveja [cadena liviana y pesada] conjugado a peroxidasa y purificado por afinidad, Rockland, PA) en PBS-T conteniendo seroalbúmina bovina 1.0 %. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 60 min con agitación y luego se lavó con PBS-T una vez durante 15 min y cuatro veces durante 5 min.

Para la reacción de quimioluminiscencia, la membrana se incubó con el reactivo Renaissance™ (DuPont NEN) durante 1 min. Luego se removió el exceso de reactivo y

se expuso a una placa radiográfica X-OMAT (Kodak) durante tiempos variables entre 10 seg y 10 min.

Puesta a punto de la técnica de Western-blot de 11β-HSD-2

El anticuerpo anti-11β-HSD-2 de rata no había sido utilizado previamente en reacciones de Western-blot por lo que fue necesario determinar las concentraciones adecuadas del mismo (primer anticuerpo) para este tipo de ensayos como así también la dilución óptima del segundo anticuerpo anti IgG de oveja [H&L] conjugado a peroxidasa. Además fue necesario determinar la especificidad del anticuerpo anti-11β-HSD-2 de rata.

Para determinar las diluciones óptimas del primer y segundo anticuerpo se realizaron diluciones seriadas de cada uno y se analizaron las combinaciones entre ellas. Para ello se realizó un minigel como se mencionó anteriormente donde se sembró 750 µg de proteína microsomal de adrenal de rata en una sóla calle. Se realizó la transferencia de

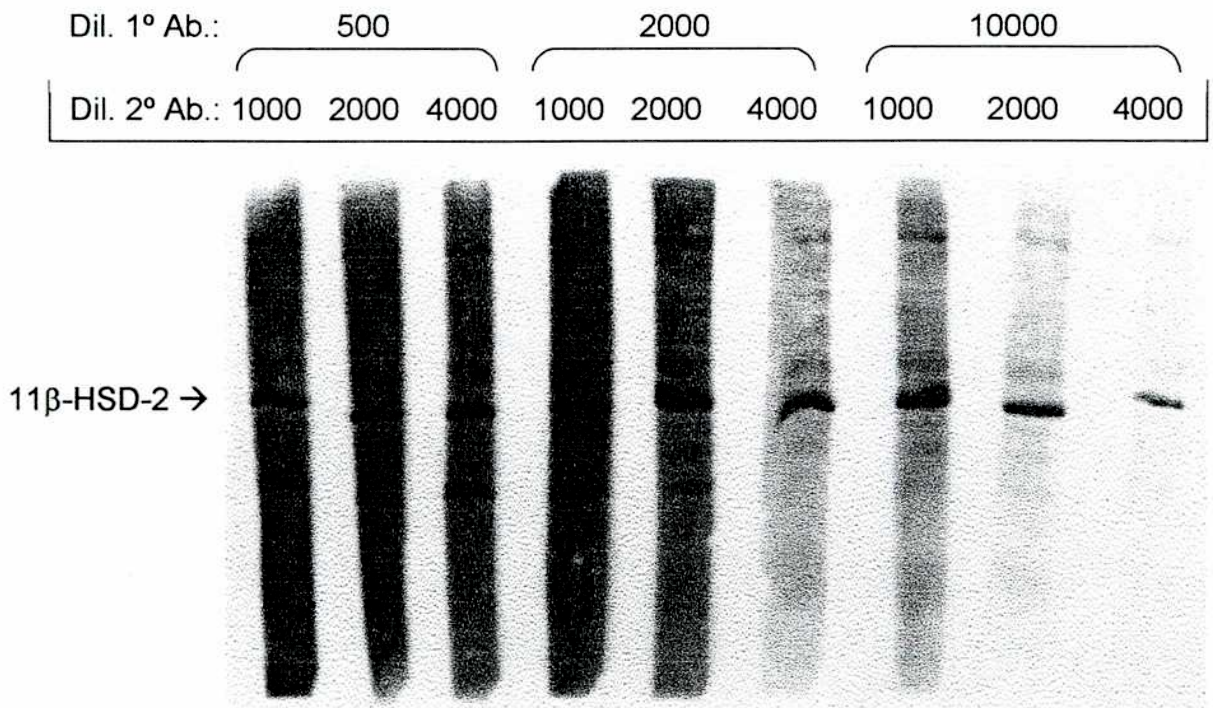


Fig. 2.2. Diluciones óptimas de 1° anticuerpo y el 2° anticuerpo anti especie conjugado a peroxidasa. Los valores de dilución representan X siendo la dilución 1/X.

las proteínas y la membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras de 0.5 cm de ancho. Las tiras (9) fueron reveladas con concentraciones crecientes de cada uno de los anticuerpos primario y secundario. En la Fig. 2.2 se observa que las diluciones óptimas de trabajo son de 1:10.000 para el primer anticuerpo y de 1:4.000 para el anticuerpo anti-especie conjugado a peroxidasa.

Con el fin de estudiar la especificidad del primer anticuerpo, se realizaron revelados con el primer anticuerpo o con suero no inmune de oveja. El primer anticuerpo o suero no inmune se utilizó en la dilución óptima hallada anteriormente (1:10.000) ó 20 veces más

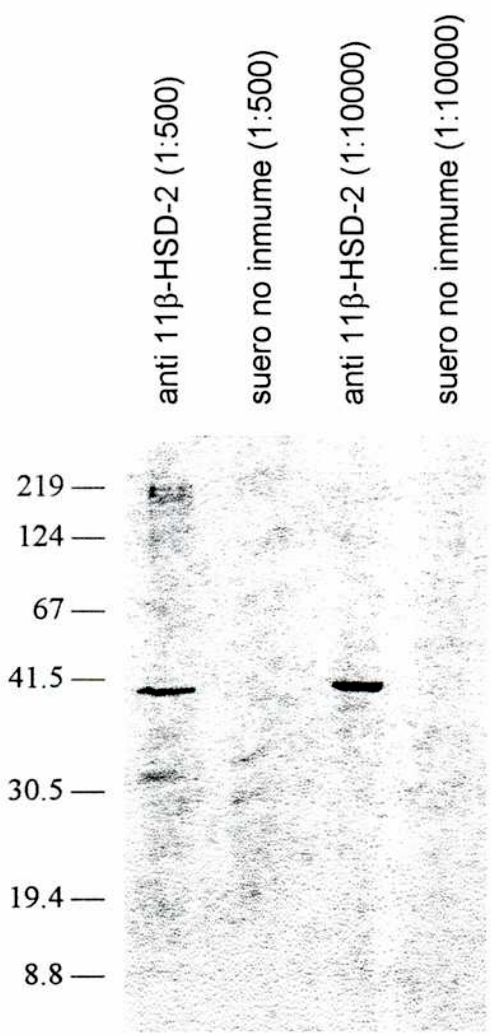


Fig. 2.3. Especificidad del anticuerpo anti 11β-HSD-2 de rata. Proteína microsomal de adrenal de rata fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las calles fueron reveladas con anticuerpo anti 11β-HSD-2 de rata o suero no inmune en diluciones 1:500 o 1:10000, y posteriormente con suero anti especie conjugado con peroxidasa en dilución 1:4000.

concentrado (1:500) para detectar más fácilmente las reacciones inespecíficas. En la Fig. 2.3 se observa que la banda correspondiente a la 11β-HSD-2 de rata se halla sólo en las calles reveladas con el primer anticuerpo específico. La banda correspondiente a la 11β-HSD-2 de rata presenta un PM de 40 kDa correspondiente al PM esperado [234]. En las calles reveladas utilizando suero no inmune de oveja como primer anticuerpo no se observan bandas.

Clonado y expresión de la 11β-HSD-2 bovina

Clonado de la 11β-HSD-2 bovina

El cDNA de la 11β-HSD-2 bovina fue clonado y secuenciado en tres fragmentos por PCR heteróloga y RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, Amplificación rápida de los extremos del cDNA). El fragmento 550-1198 bp (bp: pares de bases, se refieren a los números de bases del cDNA de la 11β-HSD-2 bovina clonada) fue amplificado por PCR utilizando "primers" basados en la secuencia del cDNA de la 11β-HSD-2 humana. Para la transcripción reversa, 5 μg de RNA total de riñón bovino fueron calentados con 100 pmoles de un "primer" de poli T por 5 min a 70 C y la reacción de transcriptasa reversa realizada en un volumen final de 20 μl de buffer conteniendo Tris-HCl 50 mM (pH: 8.3), KCl 75 mM, $MgCl_2$ 3 mM, DTT 10 mM, dNTP 0.5 mM y 200 U de transcriptasa reversa Superscript II (Gibco) durante 60 min a 42 C. La reacción se detuvo incubando 5 min a 95 C. La reacción de PCR se realizó utilizando los "primers" sentido (5'-GACCAAACCAGGAGACATTAGC-3') y antisentido (5'-AGGCAGGTAGTAGTGGATGAAG-3') con los siguientes parámetros de ciclado: un primer período de 1 min a 94 C; seguido de 30 ciclos de: 1 min a 94 C más 1 min a 50 C y 1 min a 68 C; y por último un período de extensión final de 7 min a 68 C. El producto de la reacción de PCR fue purificado y secuenciado utilizando el kit Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing y el secuenciador automático ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los extremos 5´ y 3´ del cDNA fueron amplificados por la técnica de RACE utilizando el kit Marathon cDNA Amplification (Clontech) basado en la técnica descripta

originalmente por Frohman M.A. *et al.* [406] y modificada por Chenchik A. *et al.* [407]. Brevemente, la primera hebra del cDNA fue sintetizada utilizando 1 μg de mRNA, el "primer" (5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC$(T)_{30}$(G/A/C)N-3') y la transcriptasa reversa de MMLV. La segunda hebra del cDNA fue sintetizada con un coctel conteniendo las siguientes enzimas: RNAase H, DNA polimerasa I de *E. coli* y DNA ligasa de *E. coli* seguido de un tratamiento con T4 DNA polimerasa para generar extremos romos. Finalmente fue ligado el adaptador (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') con T4 DNA ligasa. El primer ciclo de la reacción de PCR para el extremo 5´ fue realizada con el cDNA ligado, el "primer" específico b-A-1 (5'-CGACCACTTGAACGACGCAGCAGT-3') y el "primer" adaptador AP-1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), y la reacción de "Nested" PCR fue realizada con el "primer" específico b-A-2 (5'-TGAACGACGCAGCAGTGGCAAGAG-3') y el "primer" adaptador AP-2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'). Las condiciones de ciclado tanto para la reacción de PCR como para la "Nested PCR" fueron: un primer período de 1 min a 95 C; seguido de una serie de ciclos: 5 ciclos de 30 seg a 95 C más 4 min a 72 C; 5 ciclos de 30 seg a 95 C más 4 min a 70 C; 25 ciclos de 20 seg a 95 C más 4 min a 68 C. El producto de la "Nested PCR" fue purificado y clonado en un sistema TA utilizando el sistema de vectores pGEM-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y las modificaciones de Zhou M.Y. y Gomez-Sanchez C.E. [408]. Los clones fueron analizados por digestión con enzimas de restricción utilizando los siguientes conjuntos de enzimas: Apa I/Pst I y Apa I/Pst I/Hind III. Los clones positivos fueron aislados y secuenciados como se describió anteriormente.

El primer ciclo de la reacción de PCR para el extremo 3´ fue realizada con el cDNA ligado, el "primer" específico b-S-1 (5'-TACATCGAGCACTTGAATGGGCAG-3') y el "primer" adaptador AP-1 y, la reacción de "Nested" PCR fue realizada con el "primer" específico b-A-2 (5'-GCCCTGTGGTAGATGCCATCACCG-3') y el "primer" adaptador AP-2. Las condiciones de ciclado fueron: un primer período de 1 min a 94 C; seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94 C más 4 min a 68 C para la primer reacción de PCR; y un primer período de 1 min a 94 C; seguido de 25 ciclos de 30 seg a 94 C más 4 min a 68 C

para la reacción de "Nested" PCR. El producto de la reacción de "Nested" PCR fue purificado y secuenciado como se describió anteriormente.

Construcción del plásmido de expresión

Con el fin de obtener la región codificante completa se realizó una reacción de PCR utilizando los "primers" b-S-5 (5'-GCCCTCGAGCCATGGAAAGCTGGCCCTGGCCGTCG-3') y b-A-4 (5'-TGTTCTAGATGTGACCTGCTCACTGGGCAGTGG-3') que contenían sitios de corte para las enzimas de restricción Xho I y Xba I respectivamente. Las reacciones de ciclado fueron: un primer período de 1 min a 94 C; seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94 C más 3 min a 68 C; y por último un período de extensión final de 7 min a 68 C. El producto de la reacción de PCR fue purificado y cortado con las enzimas de restricción Xho I y Xba I. El inserto fue ligado con el vector de expresión pCI-neo que había sido cortado con las mismas enzimas. Los plásmidos de dos clones positivos fueron purificados y usados para las transfecciones.

Transfección transitoria y análisis enzimático

Las células CHOP [409] fueron cultivadas en placas de 12 pocillos y crecidas hasta un 50-80 % de confluencia en medio HAM F-10 conteniendo 10 % de suero fetal bovino. Los plásmidos recombinates (0.5 µg) o el plásmido pCI-neo (Control) y 3 µl de lipofectaAMINE (Gibco BRL) en 200 µl de medio sin suero fueron incubados 30 min a temperatura ambiente y luego se agregó otros 200 µl de medio sin suero. El complejo DNA-lipofectAMINE fue agregado a las células que previamente habían sido lavadas con medio sin suero, y se incubaron a 37 C durante 6 hs. Luego se agregó 400 µl de medio conteniendo 20 % de suero a cada pocillo y se continuó la incubación durante toda la noche. Luego de 16 hs se cambió el medio por medio fresco con 10 % suero fetal bovino y se continuó la incubación a 37 C durante otras 24 hs.

Para determinar la actividad catalítica de la 11β-HSD-2 bovina, las células transfectadas fueron incubadas con 1 ml de medio sin suero conteniendo 200.000 dpm de

[^{3}H]-cortisol, [^{3}H]-corticosterona o [^{3}H]-dexametasona (6-7 nM) durante 2 hs a 37 C. El medio fue extraído con 5 ml de cloruro de metileno y procesado como se detalló para la determinación de la actividad enzimática de 11β-HSD con la excepción de que las placas de TLC fueron cuantificadas con un scanner de placas de TLC (Bioscan).

Para las reacciones de reversión o los ensayos de inhibición, las células crecidas en botellas de 75 cm^2 fueron transfectadas, tripsinizadas y resuspendidas en medio sin suero. 5×10^4 Células fueron incubadas en 0.5 ml de medio sin suero con 200.000 dpm del sustrato tritiado durante 2 hs a 37 C. Los sobrenadantes fueron procesados como se describió anteriormente. Para los ensayos de inhibición se utilizó [^{3}H]-cortisol como sustrato y concentraciones crecientes de inhibidores radioinertes.

Para determinar la dependencia del cofactores y los parámeros cinéticos, las células transfectadas fueron levantadas con un "cell scraper", homogeneizadas y sonicadas en buffer de ensayo (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8.0). Los homogenatos fueron mezclados con un volumen igual de glicerol y mantenidos a –70 C, no observándose perdida de actividad durante un par de semanas.

La determinación de la actividad de la 11β-HSD-2 bovina en los homogenatos de células CHOP transfectadas fue realizado en forma similar que con las muestras de adrenal con la excepción que la cuantificación de la radiactividad asociada a las manchas correspondientes a sustrato y producto de la reacción fue cuantificada con un scanner de placas de TLC. Para determinar los parámetros cinéticos, 0.5 μg de proteína de los homogenatos se incubaron con NAD^+ 0.5 mM y 2 a 100 nM de los sustratos tritiados en 0.5 ml de buffer de ensayo durante 15 min. Posteriormente, las muestras fueron procesadas como se describió anteriormente, las manchas visualizadas a la luz UV, raspadas, eluidas de la silica on 0.5 ml de isopropanol y separadas de la silica por centrifugación. El isopropanol fue decantado en viales para su conteo por centelleo líquido.

La [^{3}H]-cortisona, [^{3}H]-11-dehidrocorticosterona y [^{3}H]-11-dehidrodexametasona fueron preparadas incubando sus respectivos derivados 11-hidroxilados con células 293 establemente transfectadas con el cDNA de la 11β-HSD-2 humana [202] durante 2 hs a 37 C. Los esteroides se extrajeron del medio de cultivo por extracción en fase sólida y se purificaron por TLC utilizando los sistemas de solventes detallados en la Tabla 2.1.

Finalmente, los productos se eluyeron de la sílica, se llevaron a sequedad y se resuspendieron en etanol.

Distribución tisular de la 11β-HSD-2 bovina

5 μg de RNA total fueron amplificados por RT-PCR usando los primers b-A-4 y b-S-1. Las condiciones de ciclado fueron: 1 min a 94 C seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94 C y 4 min a 68 C. Las muestras fueron luego analizadas en un gel de agarosa 1.2 %.

Centelleo líquido

La solución centelladora contenía PPO (2,5-difeniloxazol) 0.4 % y dimetil POPOP (1,4-bis-[4-metil-5-fenil-2-oxazolil]benceno) 0.025 % en tolueno. Las muestras de placas de TLC se cuantificaron en solución centelladora con 5 % de etanol. La radiactividad de las muestras acuosas se midió en solución centelladora con Arcopal 20 %.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford M.M. [410] y se utilizó seroalbúmina bovina como standard. La concentración proteica de los homogenatos de células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina se midió con el reactivo BCA (Pierce) utilizando el mismo standard antes mencionado.

Análisis computacional

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas fueron alineadas con el programa ClustalX versión 1.6 (1996, Julie Thompson y Toby Gibson, European Molecular Biology Laboratory -Heidelberg, Alemania) [411] y posteriormente con el programa Genedoc (1997, Nicholas K.B. y Nicholas H.B. Jr.) [412].

El análisis de hidrofobicidad se realizó con el programa Prosis (v7.00) según el método de de Kyte y Doolittle [413] con una ventana de 20 aminoácidos.

El análisis de las "islas CpG" se realizó con el programa Grail/GenQuest (http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3, Oak Ridge, TN).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de contrastes por Dunnet cuando se compararon varios tratamientos contra un control o por contrastes por Tukey cuando se realizaron comparaciones entre distintos grupos. Cuando correspondió se realizaron tests de Student o de correlación ρ de Spearman. Los resultados se expresan como medias ± Error Standard (ES), donde ES es igual a la desviación standad dividido la raiz cuadrada de n.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 7.0 (Chicago, IL, USA,1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección 1: Efecto de Endotelina en la captación y metabolismo del colesterol.

Los caminos metabólicos son regulados principalmente por las concentraciones de los sustratos y los niveles de actividad de las enzimas involucradas, siendo estos últimos muchas veces regulados por factores hormonales. Las concentraciones efectivas de los sustratos, o sea el "pool" de cada metabolito del camino metabólico en cuestión que es suceptible de ser metabolizado, están definidas no sólo por su existencia dentro de la célula sino también por su compartimentalización intracelular. Estas concentraciones efectivas de sustrato regulan la velocidad de su transformación. Por otro lado, la actividad de las enzimas puede ser regulada en forma directa o indirecta involucrando desde la regulación de la expresión génica hasta modificaciones a nivel enzimático a través de mecanismos directos e indirectos de activación/inactivación que incluyen en muchos casos mecanismos de fosforilación/desfosforilación desencadenados por hormonas.

La biosíntesis de esteroides adrenales se encuadra en estos principios generales y es regulada en los niveles antes mencionados. La regulación de esta biosíntesis comienza en la biodisponibilidad del primer sustrato de este camino metabólico: el colesterol. La captación celular del colesterol unido a lipoproteínas como su movilización entre los reservorios intracelulares, su esterificación/desesterificación, transporte a la mitocondria y más específicamente a la membrana interna mitocondrial, contituyen puntos de regulación de la esteroidogénesis simplemente por regulación de los niveles de sustrato capaces de entrar en esta vía metabólica. Una vez que el colesterol alcanza la membrana interna mitocondrial es posible que sirva como sustrato para su metabolización por el citocromo P-450$_{scc}$. En este punto comienza la regulación de la esteroidogénesis en los llamados "pasos tempranos" que se continuan cuando el sustrato sufre las últimas modificaciones enzimáticas que lo transforman en aldosterona en los llamados "pasos tardíos". Finalmente, el último paso de regulación de los niveles efectivos de esteroides que alcanzarán el torrente sanguíneo para ejercer su efecto en los órganos blanco está dado por la degradación y/o modificación que puedan sufrir en el interior celular hasta atravesar la membrana plasmática, saliendo así de la célula. La mayoría de estos pasos

de la esteroidogénesis adrenal se hallan bajo regulación hormonal, incluyendo a ACTH, angiotensina II y endotelina (ET) entre otros.

El colesterol para la esteroidogénesis puede provenir de dos fuentes distintas: 1. aporte de colesterol por medio de lipoproteínas o 2. síntesis *de novo*. El aporte de cada una de estas fuentes varía de acuerdo al órgano esteroidogénico estudiado. Mientras en la adrenal, el ovario y la placenta la mayor parte del colesterol que forma parte del "pool" esteroidogénico proviene de las lipoproteínas plasmáticas en el testículo la mayor parte proviene de la síntesis *de novo* [1,5].

Las primeras conversiones que sufre el colesterol en el camino biosintético adrenal son la transformación en pregnenolona y posteriormente en progesterona. Dichas conversiones son mediadas por el citocromo P-450_{scc} y la 3β-HSD respectivamente. El citocromo P-450_{scc} es considerada la enzima limitante de este camino metabólico [1,33].

ET-1 produce diversos efectos en los órganos endócrinos, entre ellos la glándula adrenal [67,69,71,414]. En este órgano el principal efecto es una estimulación de la aldosteronogénesis [71,414,415 y sus citas]. Este efecto se ha observado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En células aisladas de glomerulosa adrenal ET causa un incremento de la esteroidogénesis dosis dependiente [91,97,100,153,416]. En experimentos realizados con animales se ha observado también un efecto estimulatorio de ET *per se* [98,102-104]. Pecci A. *et al.* [104] describieron un modelo experimental *in vivo* para el estudio de los efectos aldosteronogénicos y vasopresores de ET que fue el usado en los experimentos de la presente sección. En este modelo, los efectos agudos de endotelina-1 (ET-1) son estudiados en ratas anestesiadas a las cuales se les inserta un cateter a través de la vena yugular y son infundidas con los agentes correspondientes durante 30-45 min a un flujo constante. En este modelo se observó que la infusión con ET-1 produce un incremento del hematocrito en forma dependiente de la concentración de ET-1 y del flujo de infusión. ET-1 también produce una disminución del volumen urinario luego de la infusión. Estos dos parámetros estarían indicando el efecto vasoconstrictor de ET-1 en este modelo experimental. A su vez, ET-1 produce un incremento en la concentración plasmática de aldosterona como así también de la concentración intraadrenal de este mineralocorticoide la cual es dependiente de la dosis de ET-1 y del flujo de infusión. Este efecto estimulatorio de la aldosteronogénesis sería

mediado al menos en parte por un incremento de la conversión de desoxicorticosterona en aldosterona por mitocondrias aisladas de adrenales de animales infundidos. Estos efectos de ET-1 sobre la adrenal serían directos y no mediados por el sistema renina-angiostensina, como había sido postulado anteriormente [102], ya que la coinfusión con enalapril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, no modifica los efectos de ET-1 mencionados anteriormente [104].

En la presente sección se presentan una serie de experimentos realizados con el fin de estudiar la regulación por ET de la aldosteronogénesis adrenal. Se estudió especificamente la regulación por ET de la captación de colesterol a partir de lipoproteínas plasmáticas y su posterior metabolización en la aldosteronogénesis. Se estudiaron las enzimas involucradas en la conversión de colesterol en pregnenolona y posteriormente en progesterona.

Biosíntesis de aldosterona

Se realizaron infusiones con agonistas y antagonistas de los receptores a ET con el fin de estudiar la respuesta del sistema bajo las condiciones de ensayo en las que posteriormente se analizará el efecto de estos agentes en la captación y metabolismo del colesterol. En la Fig. 3.1.1 se observa la concentración de aldosterona intraadrenal en ratas infundidas durante 30 min con distintos agentes. ET-1 (80 ng/Kg.min) produjo un incremento de 11.5 veces sobre los niveles basales de aldosterona intraadrenal. Las sarafotoxinas S6b y S6c (80 ng/Kg.min), agonistas de los receptores ET_B, aumentaron la producción de corticosterona en 5.4 y 5.6 veces, respectivamente. El péptido cíclico BQ-123 (280 ng/Kg.min), antagonista de los receptores ET_A, no modificó los niveles basales de aldosterona intraadrenal como así tampoco alteró el incremento producido por ET-1. Esta serie de resultados indicaría que el efecto aldosteronogénico de ET-1 en la rata es mediado por los receptores ET_B.

Aún existe controversia acerca de si el efecto estimulatorio de ET sobre la producción de aldosterona por la adrenal es directo o mediado por algún otro agente regulado por ET [414,417]. Descartada la angiotensina II [104], se estudió ACTH como mediador del efecto de ET. Con este fin, se realizaron infusiones con ET-1 durante 30 min en ratas

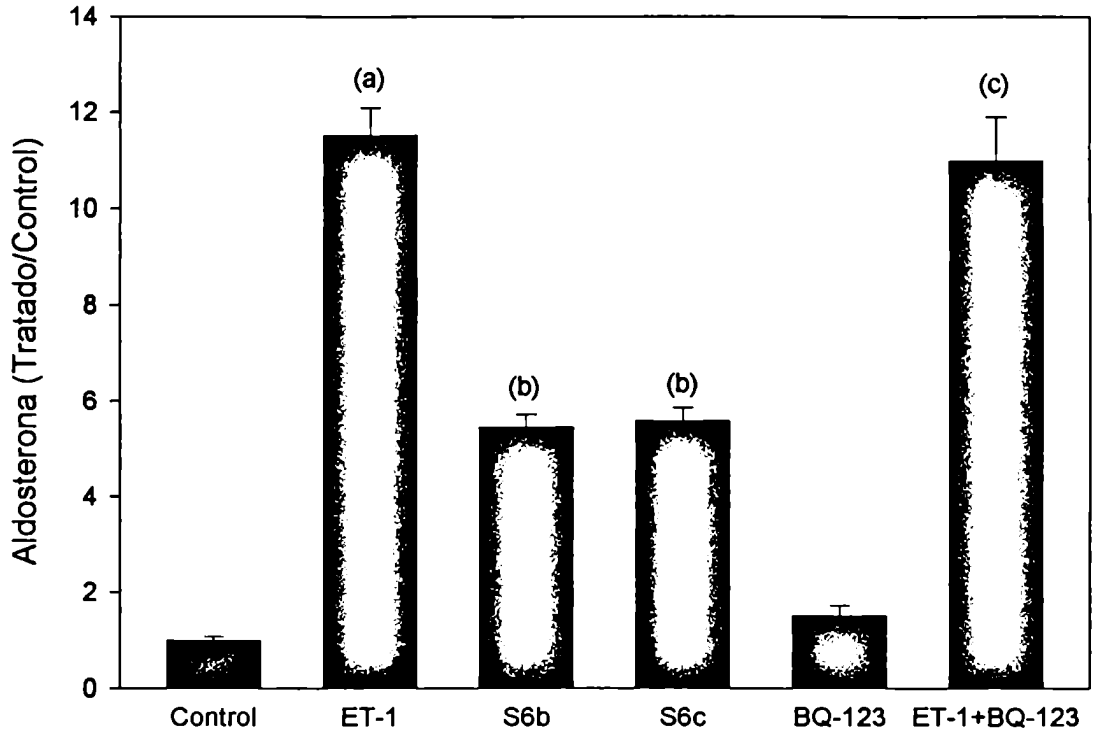


Fig. 3.1.1. Aldosterona intra-adrenal en ratas infundidas. Las ratas fueron infundidas con vehículo (control) o ET-1 (80 ng/Kg.min), Sarafotoxina 6b (S6b) (80 ng/Kg.min), Sarafotoxina 6c (S6c) (80 ng/Kg.min) durante 30 min o BQ-123 (280 ng/Kg.min) durante 45 min a un flujo de 125 µl/min. Luego se extrajeron las glándulas adrenales, se homogeneizaron y se determinó la concentración intra-adrenal de aldosterona por RIA. Los datos se presentan como media ± ES, n= 4. (a): $p < 0.001$ respecto del control; (b): $p < 0.01$ respecto del control; (c): $p < 0.05$ respecto del control y BQ-123.

normales y en animales tratados con dexametasona (0.5 mg/día.animal) durante 48 hs con el fin de disminuir al mínimo los niveles circulantes de ACTH por retroalimentación negativa. En la Fig. 3.1.2 se observa que en las ratas normales ET-1 produce un incremento cercano al 100 % en la concentración de aldosterona intraadrenal. Por otro lado, el tratamiento con dexametasona disminuye notablemente los niveles basales de producción de aldosterona pero no modifica la respuesta estimulatoria de ET-1. Los valores de las relaciones tratado/control son de 1.90 y 1.86 para los animales tratados con vehículo y dexametasona respectivamente, evidenciándose un grado similar de estimulación de la aldosteronogénesis por ET. Esto indicaría que el efecto de ET-1 sobre la adrenal es por un mecanismo posiblemente directo ya que también ocurre en ausencia de ACTH. En apoyo a esta conclusión, el efecto aldosteronogénico de ET también se obtiene en células aisladas (ver *Introducción*).

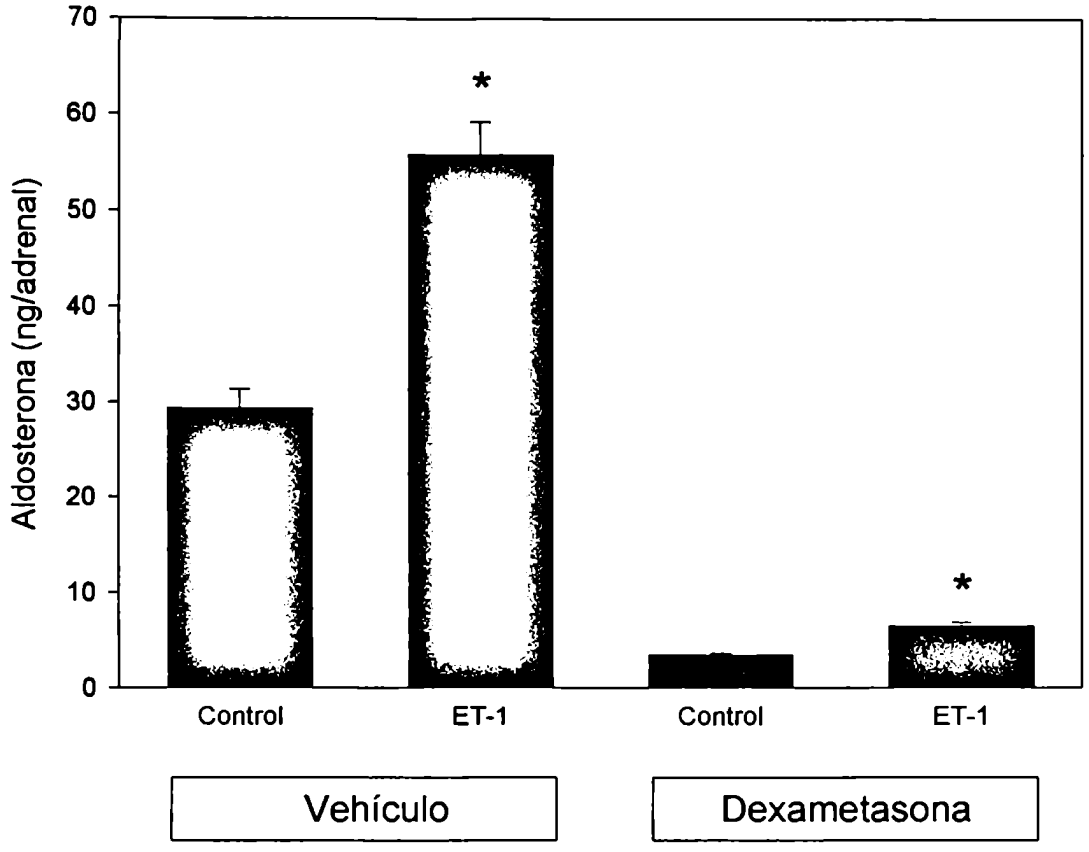


Fig. 3.1.2. Dependencia de ACTH para el efecto aldosteronogénico de ET-1. Las ratas fueron tratadas con vehículo o dexametasona (0.5 mg/animal.día) durante 2 días. Luego fueron infundidas con solución salina (control) o ET-1 (80 ng/Kg.min) durante 30 min a un flujo de 125 µl/min. Luego se extrajeron las glándulas adrenales, se homogeneizaron y se determinó la concentración intraadrenal de aldosterona por RIA. Los datos se presentan como media ± ES, n= 2. *: $p < 0.01$ con respecto a los animales control (infundidos con solución salina) en cada caso.

Incorporación de [^{3}H]-colesterol *ex vivo*

La incorporación de colesterol se estudió en un modelo experimental que hemos denominado *ex vivo* y que consistió en tratar a los animales *in vivo* con los diferentes agentes y posteriormente ensayar la incorporación de colesterol *in vitro*. Para ello, se infundieron ratas durante 30 min con las distintas drogas a ensayar y posteriormente se retiraron las glándulas adrenales, se limpiaron y fraccionaron según los casos, y se cortaron en cuartos. Los cuartos de adrenal fueron incubados con aminoglutetimida durante 15 min para bloquear la metabolización del colesterol incorporado y por lo tanto inhibir la liberación al medio extracelular de los productos biosintéticos de dicha

metabolización. Finalmente, la incorporación de colesterol fue determinada incubando los cuartos de adrenal con suero homólogo enriquecido en [^{3}H]-colesterol durante 45 min.

En la Tabla 3.1.1 se observa que ET-1 produjo un incremento del 84 % en la incorporación de colesterol en la glándula adrenal entera con respecto a los animales infundidos con solución salina (NaCl 0.9 %). ACTH también estimuló la incorporación de colesterol en un valor semejante a ET (97 % respecto del control).

Posteriormente se estudió la incorporación de colesterol discriminando entre la cápsula (zona gomerulosa) y el "core" (zona fasciculata) de la glándula adrenal. ET-1 provocó un aumento del 59 % en la incorporación de colesterol en la zona glomerulosa mientras que en la zona fasciculata no se observó ninguna variación con respecto a los controles.

Tabla 3.1.1: Incorporación *ex vivo* de colesterol en glándula adrenal de ratas infundidas.

Fracción	Hormona	Incorporación de [^{3}H]-colesterol (Tratado/Control)
Adrenal total	ET-1	1.84 ± 0.15 (4) *
	ACTH	1.97 ± 0.16 (4) *
Cápsula	ET-1	1.59 ± 0.13 (4) *
"Core"	ET-1	0.94 ± 0.05 (4)

Los datos representan media ± ES de un número independiente de experimentos indicado entre paréntesis. Los animales fueron infundidos durante 45 min con ET-1 (80 ng/Kg.min), ACTH (280 ng/Kg.min) o solución salina y luego se determinó la incorporación de [^{3}H]-colesterol en las distintas fracciones como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los valores de la incorporación de [^{3}H]-colesterol para los controles fueron de 10524, 4378 y 7100 dpm/fracción para la adrenal total, cápsula y "core" respectivamente. *: $p < 0.05$ con respecto al control.

En la glándula adrenal se ha descripto la presencia de dos subpoblaciones de receptores a ET denominados ET_A y ET_B. Con el fin de estudiar qué subpoblación de receptores median el efecto estimulatorio de la incorporación de colesterol inducido por ET-1 se

realizaron experimentos con agonistas y antagonistas de los distintos tipos de receptores a ET.

Se realizaron infusiones con el agonista de receptores ET_B, la sarafotoxina S6b, observándose que pruduce un incremento en la incorporación de colesterol aunque menor al producido por ET-1 (Fig. 3.1.3). Co-infusiones de ET-1 con el antagonista de los receptores ET_A, el péptido cíclico BQ-123, no modificaron el incremento en la captación de colesterol mediado por ET-1 (Fig. 3.1.3).

Estos resultados indicarían que el efecto estimulador de ET-1 en la incorporación de colesterol en la glándula adrenal es mediado por receptores del tipo ET_B ya que puede ser simulado al menos parcialmente con agonistas de receptores ET_B y, por otro lado,

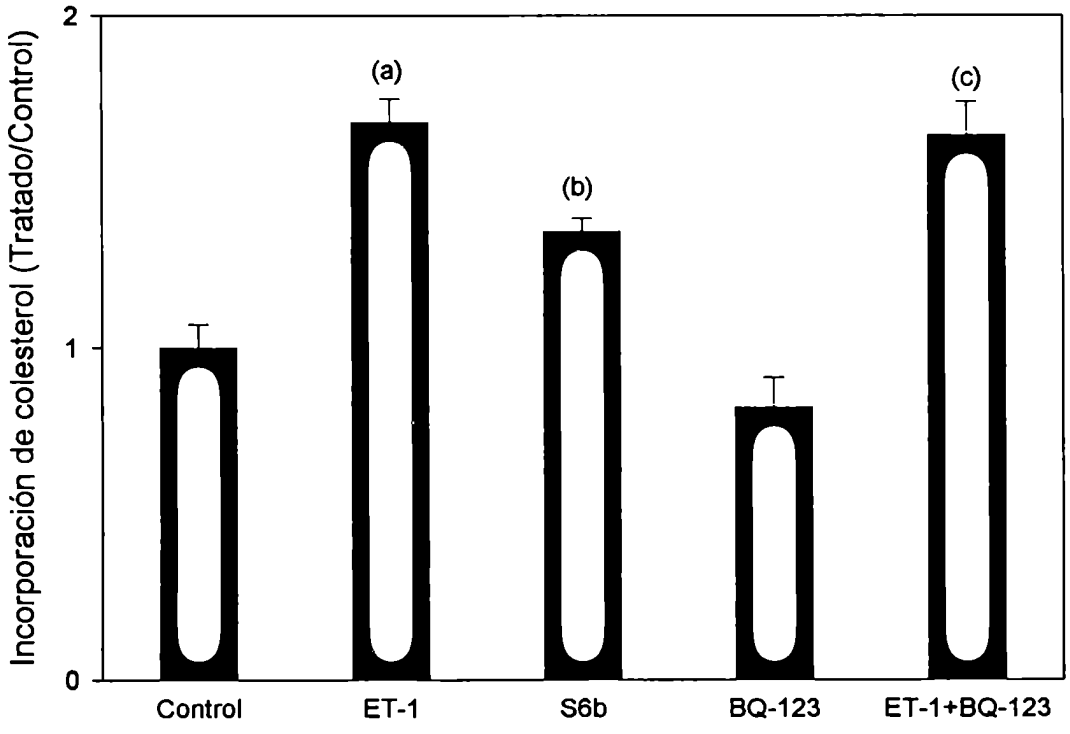


Fig. 3.1.3. Incorporación de colesterol en adrenales de ratas infundidas. Receptores involucrados. Las ratas fueron infundidas con vehículo (control) o ET-1 (80 ng/Kg.min) o S6b (80 ng/Kg.min) durante 30 min o BQ-123 (280 ng/Kg.min) durante 45 min a un flujo de 125 µl/min. Luego de la infusión las adrenales fueron extraidas y las capsulas adrenales incubadas con suero enriquecido con [^{3}H]colesterol como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los datos representan medias ± ES (n=3-4). (a) $p < 0.001$ con respecto al control; (b) $p < 0.05$ con respecto al control; (c) $p < 0.001$ con respecto al control y a BQ-123.

antagonistas de los receptores ET_A mostraron no ser efectivos en suprimir el efecto estimulatorio de ET-1.

Incorporación de [^{3}H]-colesterol *in vitro*: Suspensiones celulares.

Se estudió la incorporación de colesterol en células dispersas de glomerulosa adrenal de rata y vaca. Las células dispersas de glomerulosa adrenal de rata o vaca obtenidas por dispersión enzimática y mecánica fueron incubadas con suero homólogo enriquecido en [^{3}H]-colesterol y ET-1 durante 60 min y luego se determinó la radiactividad asociada a las células. Para evitar la metabolización del colesterol incorporado las células fueron preincubadas con aminoglutetimida (1 mg/ml), la cual también estuvo presente durante la incorporación de colesterol, ya que previamente se había observado que a esa concentración se observa una disminución de 82 ± 7 % (media ± ES, n= 3, $p < 0.02$) en la producción de pregnenolona a partir de colesterol. La misma concentración de inhibidor disminuyó en un 85 ± 16 % (media ± ES, n= 3, $p < 0.05$) la producción de aldosterona estimulada por ACTH en células adrenocorticales.

La incorporación total de [^{3}H]-colesterol en las células de glomerulosa de rata no estimuladas fue de 64284 ± 5218 dpm/10^5 células. La relación tratado/control para la incorporación total de [^{3}H]-colesterol en las células adrenales de rata fue de 1.00 ± 0.03 para los controles y de 1.08 ± 0.03 para células tratadas con ET-1 (1 nM) (media ± ES, n=3, NS). Se observó un leve incremento no significativo que difiere del efecto observado *ex vivo* anteriormente.

Otro modelo ampliamente utilizado para el estudio de la esteroidogénesis adrenal es el de las células dispersas de adrenal bovina. ET-1 también produce un importante incremento en la secreción de aldosterona en este sistema [92,108,150,151]. Con el fin de estudiar si ET-1 modifica la incorporación de colesterol en este sistema, se realizaron ensayos de incorporación de colesterol en células de glomerulosa adrenal bovina con suero homólogo enriquecido con [^{3}H]-colesterol.

En este sistema celular la incorporación total de [^{3}H]-colesterol en las células control fue de 273560 ± 33184 dpm/10^5 células, y no fue estimulado por ET-1. Las relaciones tratado/control fueron de 1.00 ± 0.03 y 1.07 ± 0.06 (media ± ES, n= 3, NS) para las

células controles y las tratadas con ET-1 respectivamente. Sin embargo, cuando la incorporación de colesterol se realizó en presencia de un exceso de suero radioinerte se observó que la incorporación específica de [^{3}H]-colesterol en las células controles fue del 42.4 ± 5.1 % del total del colesterol incorporado. En esta situación, las relaciones tratado/control fueron de 1.00 ± 0.06 y 1.28 ± 0.08 (media ± ES, n=4, $p < 0.05$) para las células controles y las tratadas con ET-1 respectivamente. Así, es posible que la incorporación específica de colesterol esté enmascarada por una alta incorporación inespecífica de colesterol a la célula. En efecto, ET-1 no estimuló significativamente la incorporación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas en células de glomerulosa de rata y vaca. Sin embargo en este último caso, al incubar con un exceso de suero radioinerte con el fin de estimar la incorporación inespecífica, se observó un incremento de la incorporación específica (total – inespecífica) por ET-1.

Actividad del citocromo P-450$_{scc}$

Una vez observado que ET-1 poseía un efecto regulatorio sobre la captación de colesterol por la zona glomerulosa de la glándula adrenal se decidió estudiar si esta hormona ejercía algún tipo de regulación sobre las actividades de las enzimas involucradas en los primeros pasos de la biosíntesis de la aldosterona. Se estudió la regulación de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ y la 3β-HSD por ET-1 utilizando el mismo modelo experimental de infusiones en ratas anestesiadas.

Con el fin de poner a punto la técnica para la cuantificación de la actividad enzimática de P-450$_{scc}$ se procedió a validar el método de su determinación. Para ello, se preincubaron alícuotas de homogenatos y de la fracción mitocondrial de adrenal de rata en presencia o ausencia de cianocetona (inhibidor de la enzima 3β-HSD) y luego se incubaron con [^{3}H]-colesterol y NADPH como cofactor. Finalizada la incubación, se adicionó una alícuota de [^{14}C]-pregnenolona como trazador, los esteroides fueron extraidos con acetato de etilo, particionados entre heptano y etanol-agua, concentrados y analizados por HPLC como se describe en *Materiales y Métodos*.

En la Fig. 3.1.4-A se observa que cuando la fracción mitocondrial es incubada con [^{3}H]-colesterol se obtienen en el análisis por HPLC una serie de picos de radiactividad

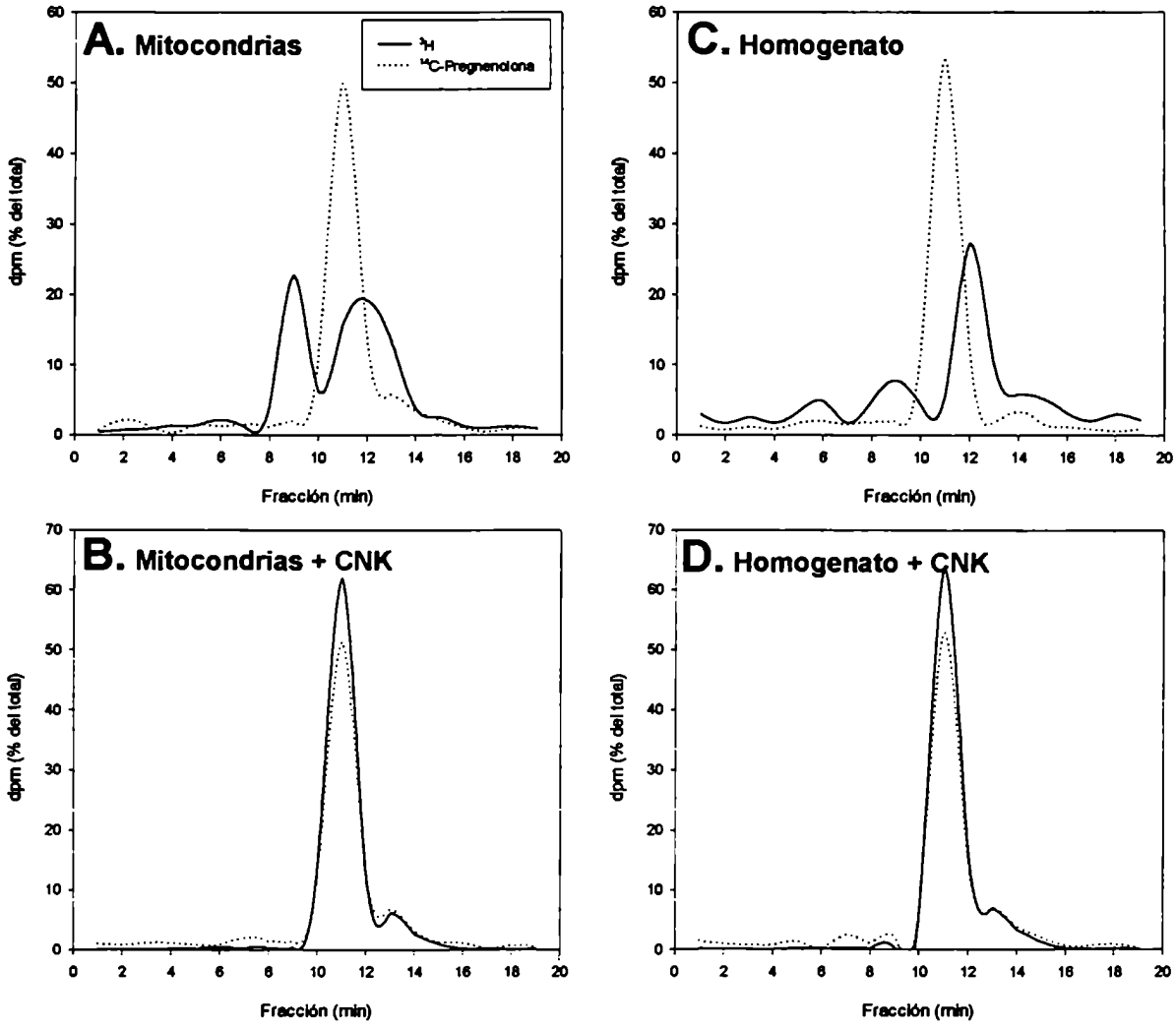


Fig. 3.1.4. Perfil de elución de ^{3}H y ^{14}C en fracciones incubadas con [^{3}H]-colesterol analizadas por HPLC. Alicutas de la fracción mitocondrial (A,B) u homogenatos (C,D) fueron incubados con [^{3}H]-colesterol y NADP en ausencia (A,C) o presencia (B,D) de cianocetona (CNK, 20 μM) durante 20 min a 37 C. Luego, a los sobrenadantes se les adicionó [^{14}C]-pregnenolona y, fueron extraidos, particionados y analizados por HPLC (columna C-18, solvente: metanol:agua (8:2)). Se recogieron fracciones cada 1 min y se determinó la radioactividad de ^{3}H y ^{14}C en cada una de ellas.

correpondientes a diversos compuestos del metabolismo del colesterol. Ninguno de ellos es predominante y del análisis con respecto al trazador de [^{14}C]-pregnenolona se observa que no más del 33 % de la marca tritiada corresponde a pregnenolona haciendo una sobreestimación debido a la superposición de picos. Cuando se realiza una incubación similar con la fracción mitocondrial pero en presencia de 20 μM cianocetona se obtiene un sólo pico de radiactividad que co-eluye con la [^{14}C]-pregnenolona (Fig. 3.1.4-B).

Estos resultados indican que en presencia de cianocetona está completamente inhibida la metabolización de la pregnenolona y así se valida el método de cuantificación en cuanto que la radiactividad asociada a la mancha correspondiente a pregnenolona en la TLC puede ser considerada libre de otros esteroides y una medida directa de la actividad del citocromo P-450_{scc}. Posteriormente se estudió si la determinación de esta actividad enzimática podía realizarse en homogenatos. En la Fig. 3.1.4-C se observa que al incubar homogenatos de adrenal de rata con [^{3}H]-colesterol se producen varios picos correspondientes al metabolismo del colesterol radiactivo. La fracción correspondiente a la pregnenolona es mínima debido a que se hallan todas las enzimas esteroidogénicas presentes y ésta es un metabolito intermediario que no se acumula. Cuando los homogenatos son incubados en presencia de cianocetona se produce un sólo pico que coeluye con la [^{14}C]-pregnenolona como en las incubaciones con mitocondrias (Fig. 3.1.4-D). Esto indica que la determinación de la actividad del citocromo P-450_{scc} puede realizarse con homogenatos en presencia de cianocetona sin la necesidad de obtener la fracción mitocondrial.

Posteriormente se determinó la cantidad de proteína del homogenato y el tiempo de incubación óptimos para la medición de la actividad enzimática bajo las condiciones ensayadas dentro de un rango lineal. Para ello se utilizaron cantidades de proteínas totales de homogenato entre 10 y 200 µg y tiempos de incubación entre 10 y 60 min. Se obtuvieron como valores óptimos para el ensayo 50 µg de proteína y 15 min de incubación.

Para estudiar el efecto regulatorio de ET-1 sobre la actividad del citocromo P-450_{scc} adrenal se infundieron ratas con ET-1 durante 30 min, se extrajeron las adrenales, se homogeneizaron y se determinó la actividad enzimática en presencia de cianocetona.

La infusión con ET-1 produjo un incremento significativo en la relación tratado/control de la actividad enzimática del citocromo P-450_{scc} con respecto a la infusión con solución salina de 1.45 ± 0.07 ($n= 6$, $p < 0.002$).

Subpoblaciones de receptores involucradas

Para estudiar cuál de las dos subpoblaciones de receptores a ET está involucrada en el incremento de la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ se realizaron infusiones con agonistas y antagonistas de ambas subpoblaciones de receptores. Se utilizaron como agonistas de los receptores ET_B las sarafotoxinas 6b y 6c. La actividad de citocromo P-450$_{scc}$ no se modificó en las infusiones con sarafotoxina 6b con respecto a las infusiones con solución salina obteniéndose una relación de tratado/control de 1.07 ± 0.05 (n= 6, NS); resultados similares se obtuvieron al infundir sarafotoxina 6c obteniéndose una relación de tratado/control de 0,96 ± 0,11 (n= 3, NS) (Fig. 3.1.5). Estos resultados indicarían que el aumento de actividad de citocromo P-450$_{scc}$ producido por ET-1 no sería mediado por

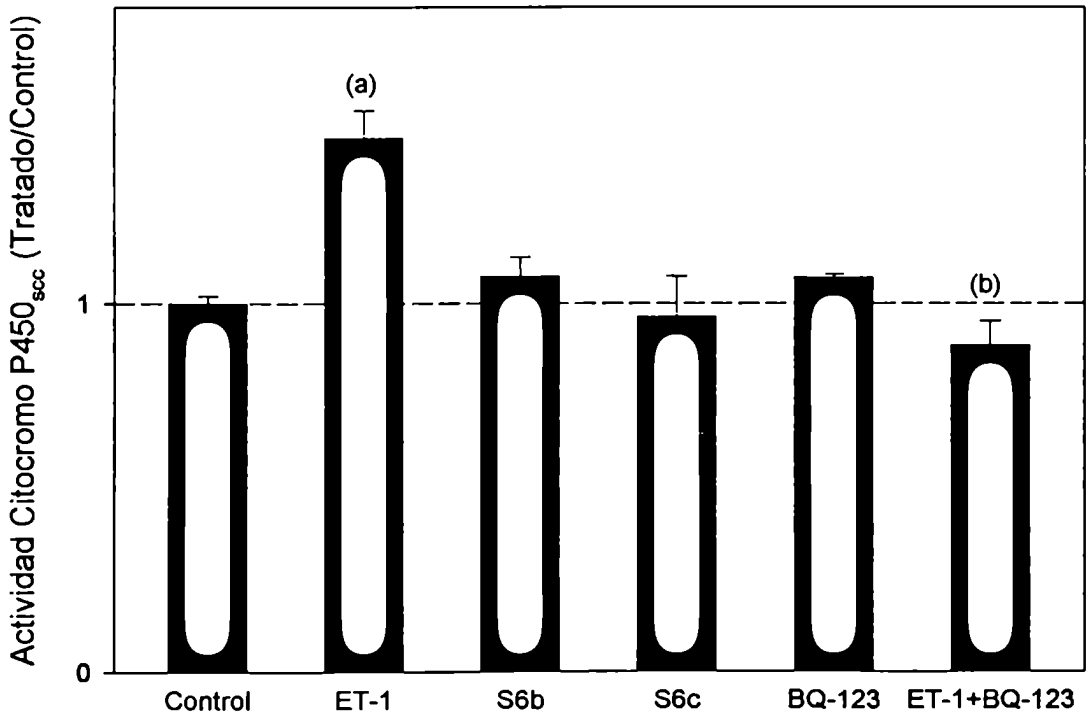


Fig. 3.1.5. Efecto de Endotelina en la actividad del citocromo P450$_{scc}$. Receptores involucrados. Las ratas fueron infundidas con vehículo (control) o ET-1 (80 ng/Kg.min), S6b (80 ng/Kg.min), S6c (80 ng/Kg.min) durante 30 min o BQ-123 (280 ng/Kg.min) durante 45 min a un flujo de 125 µl/min. Luego se extrajeron las glándulas adrenales, se homogeneizaron y se determinó la actividad del citocromo P450$_{scc}$ como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos representan medias ± ES (n=3-4). (a): $p < 0.01$ respecto del control; (b): $p < 0.01$ respecto de ET.

receptores del tipo ET_B. Posteriormente se estudió el efecto de BQ-123 que es un antagonista de los receptores ET_A sobre la actividad del citocromo $P\text{-}450_{scc}$. BQ-123 por si sólo no tuvo efecto ya que no se diferenció del control (T/C=1.07) pero al coinfundir ET-1 con BQ-123 no se produjo el incremento de la actividad enzimática observado con ET-1 (T/C=0.89) (Fig. 3.1.5). Este resultado indicaría que los receptores ET_A serían los encargados de mediar el incremento de actividad del citocromo $P\text{-}450_{scc}$ producido por ET-1.

Actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ5 isomerasa

Para la obtención de las condiciones óptimas para el ensayo de la actividad enzimática de 3β-HSD se realizaron curvas de concentración proteica del homogenato de adrenal y de tiempo de incubación. Se ensayaron concentraciones en el rango de 0,5 a 250 µg de proteina/ml y tiempos de incubación entre 5 y 30 min; obteniéndose como valores óptimos para las condiciones del ensayo concentraciones proteicas de 10 µg/ml y un tiempo de incubación de 10 min.

Posteriormente se realizaron infusiones con ET-1 y se determinó la actividad enzimática de 3β-HSD. ET-1 no modificó la actividad enzimática de 3β-HSD, obteniéndose un valor tratado/control de 0,95 ± 0,08 (n= 3, NS) para la conversión de pregnenolona en progesterona con un valor absoluto de 22 nmoles de progesterona/µg de proteína.min para los controles. De esta forma, en este modelo experimental, ET-1 parece no modificar la actividad de la 3β-HSD.

Discusión

Los resultados presentados en esta sección demuestran que el efecto aldosteronogénico de ET-1 es mediado entre otros factores por un incremento en la incorporación de colesterol proveniente de las lipoproteínas plasmáticas y en la actividad enzimática del citocromo $P\text{-}450_{scc}$. Estos incrementos serían mediados por distintas subpoblaciones de receptores a ET. La incorporación del colesterol sería mediada por los receptores ET_B

mientras que la actividad del citocromo P-450_{scc} sería mediada por la subpoblación de los receptores ET_A.

La glándula adrenal, como todos los órganos esteroidogénicos, es capaz de sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato [5,171,418]. Esto fue demostrado mediante experimentos de la incorporacion de [^{14}C]-acetato en colesterol y sus productos esteroidogénicos.

Sin embargo, diversas líneas evidencian que el colesterol esteroidogénico en la adrenal proviene principalmente de la captación de colesterol proveniente de lipoproteínas.

Morris M.D. y Chaikoff I.L. [419] observaron que en ratas alimentadas crónicamente con colesterol radiactivo, la actividad específica (AE) del colesterol plasmático y adrenal alcanzaban un "plateau" a las dos semanas. La AE del colesterol adrenal era un 80 % de la AE del colesterol plasmático. En ratas alimentadas con una dieta normal, en el contenido de colesterol, el 77 % del colesterol adrenal proviene de la dieta y el 23 % restante proviene de síntesis *de novo* realizada en su mayor parte (98 %) en tejidos extra-adrenales.

Más evidencia acerca del rol de las lipoproteínas en la esteroidogénesis adrenal fue aportada por experimentos realizados con ratas tratadas con 4-aminopirazolo[3,4-d]pirimidina (4-APP). 4-APP es una análogo de adenina que inhibe la secreción hepática de lipoproteínas [420-422] reduciendo los depósitos intracelulares de ésteres de colesterol en la adrenal y disminuyendo la concentración plasmática de corticoides pero aumentando la síntesis *de novo* de colesterol [423,424]. Estos efectos del 4-APP pueden ser revertidos por la administración de lipoproteínas por vía *i.v.* [425-427].

La HMG-CoA reductasa es la enzima limitante en la síntesis de colesterol. Se determinó la velocidad máxima que puede alcanzar la HMG-CoA reductasa adrenal en condiciones óptimas utilizando extractos provenientes de ratas tratadas con 4-APP donde se halla estimulada. Se observó que la velocidad de síntesis de colesterol es menor del 20 % de la capacidad de síntesis de esteroides de la adrenal [428-430].

Este conjunto de resultados junto con el hecho que las hormonas que estimulan la esteroidogénesis adrenal causan un incremento tanto en la captación de colesterol [6,14,431-433] como en la expresión de los receptores específicos [6,13,434,435] indica

que aunque la adrenal posee una vía metabólica para la síntesis de colesterol endógeno, el colesterol utilizado como sustrato en la esteroidogénesis proviene en su mayor parte – si no casi exclusivamente- de la captación de colesterol unido a lipoproteínas.

La administración aguda de ACTH en ratas produce un incremento en la captación de colesterol marcado unido a lipoproteínas [431,432] como asi también del número de receptores a LDL [13,436] y HDL [436-438]. Las ratas tratadas con ACTH durante 3 a 24 hs e inyectadas con [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas por vía *i.v.* muestran un incremento del 50 % en la captación de [^{3}H]-colesterol por la adrenal. Este aumento en la captación de colesterol se incrementa hasta 6 veces sobre el control cuando las ratas son tratadas con aminoglutetimida [432].

Gwynne J.T. *et al.* [431] reportaron un sistema *ex vivo* similar al de los experimentos presentados en esta sección donde las ratas son tratadas durante 24 hs con ACTH y posteriormente se determina la captación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas *in vitro*. ACTH produjo un incremento cercano al 100 % en la captación de [^{3}H]-colesterol-HDL.

En nuestro sistema, infusiones con ACTH de sólo 45 min arrojaron valores similares de estimulación de la captación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas del 97 % (Tabla 3.1.1) semejantes a los mencionados anteriormente [431].

La infusión de ET-1 produjo un incremento del 84 % en la captación del complejo [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas (Tabla 3.1.1) similar al producido por ACTH. En estas condiciones (dosis: 80 ng/Kg.min de ET-1, flujo: 125 µl/min) ET-1 produce una fuerte estimulación de la aldosteronogénesis adrenal (Fig. 3.1.1 y [104]).

El efecto estimulatorio de la captación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas producido por ET-1 es específico de la cápsula (zona glomerulosa) no observándose diferencias respecto de los controles en la región interna de la adrenal ("core": incluye zona fasciculata-reticularis y médula) (Tabla 3.1.1).

La estimulación crónica de la esteroidogénesis por ACTH lleva a una disminución de los contenidos intraadrenales de colesterol [44,431]. Efectos semejantes se han observado en infusiones crónicas con ET-1 (7 días) donde, mediante estudios histológicos, se ha observado que este tratamiento produce una disminución de las gotas lipídicas específica de la zona glomerulosa [98]. Sin embargo, se ha observado que tratamientos agudos con

ET-1 producen un incremento (90-145 %) en el contenido endógeno de colesterol total [439,440], observándose este efecto principalmente en la zona glomerulosa [440].

Cabe mencionar que se ha reportado la presencia de receptores a ET tanto en la zona glomerulosa como en la fasciculata adrenal [91,94,96,441-446]. En la zona glomerulosa se expresan los receptores ET_A y ET_B mientras que en la fasciculata sólo se expresan los receptores ET_B [96,441,442].

La estimulación de la aldosteronogénesis en la zona glomerulosa mediada por ET está ampliamente aceptada [67 y sus citas,71] mientras que la regulación de la síntesis de glucocorticoides por la zona fasciculata es aún motivo de controversia. Según diversos autores la secreción de glucocorticoides (cortisol o corticosterona) no es afectada [95,98,100,153 y sus citas] o es estimulada en forma dosis dependiente por ET en ratas y humanos [99,154,441,442,447].

Se ha reportado que ACTH produce un incremento en la liberación de ET-1 por la adrenal [99,158]. Esto llevaría a pensar que los efectos de ET-1 podrían ser distintos cuando actúa en forma sistémica o parácrina y que variaciones en las preparaciones celulares podrían explicar estas diferencias observadas.

Por lo tanto, no es llamativo que ET-1 no incremente la captación de [^{3}H]-colesterol por la zona fasciculata como ACTH ya que el efecto de ET-1 sobre esta zona adrenal no parece claro.

La estimulación de la secreción de aldosterona por ET-1 es mediada por los receptores ET_B [96,442,447-450] aunque algunos autores proponen que sería por los ET_A [441,451,452] o por ambos [453,454]. En las infusiones agudas con ET-1 la respuesta sería mediada por los receptores ET_B [96,450] (Fig. 3.1.1) siendo, posiblemente, uno de los mecanismos involucrados en esta estimulación es el aumento de la incorporación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas (Fig. 3.1.3).

Los receptores ET_B se hallan en las zonas glomerulosa y fasciculata por lo que en un principio la ausencia de receptores específicos no sería una explicación posible de la ausencia de efecto de ET-1 en la incorporación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas en la zona fasciculata.

Posteriormente se estudió el efecto de ET-1 en la captación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas en células aisladas de glomerulosa adrenal de rata y vaca con el fin de determinar el efecto directo de ET sobre dichas células. ET-1 produjo un leve incremento en la captación de colesterol que no fue significativo. Resultados similares fueron observados por otros autores en la incorporacion de colesterol mediada por ACTH. Mientras ACTH incrementa la captación de colesterol radioactivo unido a lipoproteínas *in vivo* [432] y *ex vivo* [431] no se observó efecto de esta hormona en células dispersas adrenocorticales [427]. La ausencia de efecto de ET-1 podría estar causada por algún daño en los receptores de lipoproteínas de la membrana celular causado durante el aislamiento de las células con colagenasa o por un enmascaramiento de la captación específica por la unión inespecífica del complejo colesterol-lipoproteínas como se evidenció con las células de origen bovino. Si ésta no fuese la causa, estos resultados sugerirían que la estimulación de la captación de colesterol mediada por ET-1 en las glándulas adrenales involucra mecanismos directos e indirectos, siendo estos últimos perdidos cuando se trabaja con células aisladas.

En este órden de ideas, una hipótesis posible es que el mecanismo indirecto pueda involucrar la liberación de ACTH o angiostensina II mediada por ET. Sin embargo, los efectos esteroidogénicos de ET parecen ser independientes de la secreción de ACTH como se evidenció cuando se infundieron con ET-1 ratas tratadas con dexametasona para inhibir la secreción de ACTH (Fig. 3.1.2). Por otro lado, la estimulación de la producción de aldosterona por ET-1 es independiente de la acción de angiostensina II, dado que la coinfusión de enalapril no modifica la capacidad aldosteronogénica de ET-1 [104]. Sin duda se requiere de nuevos experimentos para dilucidar este hecho.

Diversos autores [10,13,455,456] han informado estudios realizados con animales tratados con agentes que disminuyen los niveles plasmáticos de lipoproteínas como ser 4-APP [421,422,424] o 17α-etinil-estradiol [427,457]. Estos animales presentan bajos niveles plasmáticos de lipoproteinas (hipolipoproteínemia) y consecuentemente de colesterol [458,459]. Esto lleva a una depleción en los depósitos intracelulares de colesterol en la adrenal [427,458-460]. Bajo estas condiciones se incrementan los efectos observados en la captación de colesterol [10,13,427] y hasta pueden llegar a visualizarse efectos antes no observados [456,461]. Esto se debe a que al no contar con reservas intracelulares de colesterol las células esteroidogénicas presentan una fuerte demanda de

colesterol-lipoproteínas ya que aunque la síntesis endógena de colesterol se halla fuertemente incrementada no alcanza a satisfacer las demandas de sustrato en células estimuladas.

Sin embargo, estos agentes hipolipoproteiniantes producen diversos efectos a nivel adrenal y de su regulación que alejan al organismo de la situación fisiológica normal. 4-APP causa hipertrofia adrenal [455,458,462] semejante a la causada por ACTH [1,458,463,464] debido a un aumento en el volumen celular de las células adrenocorticales [455,458]. 4-APP produce una reducción en los niveles plasmáticos de corticosterona tanto basales como estimulados con ACTH [422,455] posiblemente por una disminución de la disponibilidad de colesterol ya que puede ser revertido por la administración previa de HDL por vía *i.v.* [459]. Además, 4-APP causa aumento en los niveles plasmáticos de ACTH [465,466] por disminución de la retroalimentación negativa causada por corticosterona. 4-APP produce un aumento en la incorporación de colesterol-lipoproteínas como en el número de receptores a lipoproteínas [13,427]. Sin embargo este efecto se bloquea en animales en los que la secreción de ACTH está inhibida por la administración de dexametasona que actúa por retroalimentación negativa [460,466]. Por lo tanto, aunque ACTH *per se* aumenta la captación de colesterol por la adrenal en animales tratados con 4-APP, el efecto propio de 4-APP podría deberse en parte al incremento de la secreción de ACTH. Animales tratados con 4-APP presentan fragmentación nucleolar indicando alteración en la síntesis de RNA ribosomal por inhibición de la síntesis *de novo* de purinas [467]. Además, 4-APP puede modular los niveles de receptores como se ha observado con los receptores a hCG en células de Leydig [468].

Bajo estas condiciones, el estudio de la captación de colesterol mediado por ET en la adrenal en animales hipolipoproteinímicos tendría poco sentido fisiológico por no hallarse en condiciones normales, si además se tiene en cuenta que ACTH aumenta la secrecíon de ET en la adrenal [99,158].

El perfil lipoproteico varía según la especie estudiada. Así mientras en el hombre el 60-70 % del colesterol circulante está asociado a LDL, en la rata y el bovino el 70-80 % está asociado a HDL [5,469,470]. Tanto los receptores a LDL como a HDL son regulados por hormonas esteroidogénicas (ACTH, angiotensina II) en diversas especies aunque su

importancia fisiológica es distinta tanto por la disponibilidad de ligando como por la capacidad de las distintas lipoproteínas de estimular la esteroidogénesis adrenal.

En la rata tanto HDL como LDL exógenas son capaces de incrementar la esteroidogénesis en células estimuladas de glomerulosa [437,456,461] o fasciculata [427,437] adrenal aunque, como se mencionó anteriormente, HDL sería la predominante en condiciones fisiológicas. En bovinos se observa una situación similar en células de glomerulosa [433,471] y fasciculata [12,472-474]. En fasciculata bovina la preferencia por una u otra lipoproteína variaría según las células utilizadas sean aisladas en suspensión [472] [474]o cultivos celulares primarios [12].

ET-1 estimula la esteroidogénesis en células de glomerulosa adrenal bovina en cultivo [91,92] a través de receptores específicos [91,92]. Además de presentar un efecto *per se*, ET-1 produce un efecto de potenciación de la esteroidogénesis estimulada por angiotensina II [150] o ACTH [150,151]. Con el fin de estudiar el efecto de ET-1 en la incorporación de colesterol se ensayó su efecto en este sistema ampliamente utilizado para el estudio de la esteroidogénesis adrenal y su regulación. En células aisladas de glomerulosa bovina –como en rata- se observó un leve incremento no significativo en la incorporación de colesterol. Sin embargo, cuando las células de glomerulosa bovina fueron incubadas con un exceso de suero no marcado se produjo un desplazamiento de la incorporación de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas. Bajo estas condiciones, ET-1 produjo un incremento del 28 % en la incorporación de colesterol. Esto probablemente indicaría que el efecto estimulatorio de ET-1 no fue observado debido a los altos niveles de incorporación inespecífica.

Los altos niveles de incorporación inespecífica de [^{3}H]-colesterol se deben no sólo a la unión sin especificidad de las lipoproteínas a las células sino más probablemente a lo que se conoce como "intercambio colisional" [475]. El intercambio colisional puede ocurrir entre las células y todas las lipoproteínas, aunque las velocidades de transferencia no son iguales [475]. Se incrementa linealmente con la concentración de lipoproteínas, no requiere un metabolismo celular activo y disminuye al bajar la temperatura. La colisión entre las lipoproteínas y las células no lleva en general a un incremento neto en la incorporación de colesterol, pero da cuenta de la rápida equilibración entre el colesterol libre de las lipoproteínas y los "pooles" de la membrana celular [5].

Algunos autores han tratado de contrarrestar este inconveniente utilizando una estrategia experimental diferente consistente en el uso de lipoproteínas marcadas con ^{125}I en sus apoproteínas para determinar la captación de colesterol-lipoproteínas en la adrenal. En este punto es importante indicar las diferencias existentes en el metabolismo de las distintas lipoproteínas.

La captación del colesterol unido a LDL es ampliamente conocida e involucra una endocitosis mediada por un receptor específico, la degradación lisosomal de la lipoproteína y la liberación del colesterol y otros lípidos en el interior celular [15,476]. Por otro lado, la vía por la que el HDL aporta el colesterol a las células aún no está completamente caracterizada. Esta vía es diferente de la utilizada por LDL e involucraría un mecanismo denominado "captación selectiva" que no está asociada a la endocitosis de las lipoproteínas y su degradación en los lisosomas [435]. En cambio, los ésteres de colesterol son transferidos de la HDL a las células y la HDL depletada de lípidos es liberada al fluido extracelular [435,477-480]. Se ha postulado recientemente que el receptor SR-BI ("Scavenger Receptor class B type I") sería posiblemente el receptor de HDL [479]. El SR-BI se expresa en los tejidos esteroidogénicos y en el hígado [479,481,482]. Animales con deleción del gen de SR-BI presentan una duplicación en la concentración plasmática de colesterol y una disminución al 30 % del contenido adrenal de colesterol [483]. Esta vía de captación selectiva es particularmente activa en los tejidos esteroidogénicos de ratas y ratones [477,478,484]. El SR-BI se expresa en las zonas glomerulosa y fasciculata de la corteza adrenal de ratas [481] y ratones [438]. ACTH produce un importante aumento en la expresión adrenal de SR-BI tanto *in vivo* como *in vitro* [438].

Por lo tanto, en tejidos y especies donde la vía principal de incorporación de colesterol es mediado por HDL las [^{125}I]-lipoproteínas (más especificamente, las [^{125}I]-HDL) son útiles para la determinación del número de receptores y sus variaciones pero al no ser endocitadas no se produciría en la glándula adrenal una acumulación lineal de la marca en el tiempo llegándose a la saturación rápidamente. En estos casos, la utilización de [^{3}H]-colesterol-lipoproteínas sería una medida más precisa de las variaciones fisiológicas en la incorporación de colesterol.

Una vez determinado el efecto estimulador de la captación de colesterol por ET-1 en la zona glomerulosa de la adrenal de rata y vaca se procedió al estudio de las dos primeras enzimas estereoidogénicas: el citocromo P-450$_{scc}$ y la 3β-HSD.

ET-1 produjo un incremento del 45 % en la actividad enzimática del citocromo P-450$_{scc}$ (Fig. 3.1.5). Otras hormonas esteroidogénicas como ACTH o angiotensina II incrementan la síntesis de pregnenolona a partir de colesterol [1,463,485].

Aunque en un principio se consideró a la conversión de colesterol en pregnenolona como el paso limitante, en la actualidad se considera que el transporte del colesterol a la membrana interna mitocondrial –dónde se halla el citocromo P-450$_{scc}$- sería el verdadero paso limitante [18]. Entre otros candidatos, la denominada "StAR protein" sería el más firme como proteína regulatoria de la esteroidogénesis aguda [18,486 y sus citas]. Esta proteína se expresa en tejidos esteroidogénicos bajo estimulación aguda o crónica [18,49,486] y aumenta el pasaje del colesterol a la membrana interna mitocondrial y a los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales [487]. Por lo tanto, la determinación de la produción de pregnenolona en las condiciones del presente trabajo podría no sólo incluir variaciones en la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ sino además en los distintos mecanismos que llevan a un incremento en los niveles de colesterol en la membrana interna mitondrial con el subsecuente aumento en la producción de pregnenolona.

La estimulación del citrocromo P-450$_{scc}$ (o la producción de pregnenolona, más ampliamente) producida por ET-1 sería mediada por los receptores ET_A ya que el efecto de ET-1 fue revertido por BQ-123 (antagonista ET_A) y los agonistas de los receptores ET_B (S6b y S6c) no presentaron ningún efecto sobre la actividad del citocromo P-450$_{scc}$ (Fig. 3.1.5) a pesar de estimular la esteroidogénesis (Fig. 3.1.1).

Como se mencionó anteriormente, aún no está completamente dilucidado cuál/es de los subtipos de receptores a ET se hallan involucrados en la respuesta esteroidogénica adrenal. Varios trabajos de nuestro laboratorio [92,96,450] y de otros autores [442,447] indican que el efecto esteroidogénico de ET *per se* sería mediado por los receptores ET_B mientras que el efecto potenciador de ET sobre la aldosteronogénesis inducida por angiotensina II sería por los receptores ET_A [108]. Infusiones con IRL 1620 (80 ng/Kg min), agonista específico de los receptores ET_B [488,489], produce un aumento de 3.6

veces en el contenido intraadrenal de aldosterona (datos no mostrados). Dado que el incremento de la conversión de colesterol en pregnenolona es mediado por los receptores ET_A este podría ser uno de los mecanismos por los cuales ET produciría su efecto potenciador, incrementando la actividad enzimática del paso limitante de la esteroidogénesis.

Por otro lado, la actividad 3β-HSD no mostró variaciones en su actividad bajo el tratamiento con ET-1. Existe controversia acerca de la regulación por ACTH de la expresión de 3β-HSD; mientras Trudel C. *et al.* [464] reportan un aumento en los niveles de mRNA y de proteína de 3β-HSD en tratamientos agudos, otros autores no observan variaciones en condiciones similares [49]. Cuando se determinó la actividad de 3β-HSD en animales estimulados con ACTH no se observó variaciones cuando se expresó por masa de proteína (como en este trabajo) aunque sí se observó un incremento al expresarlo por número de células [490,491].

Estos resultados muestran que ET-1 estimula la aldosteroidogénesis adrenal a través de un incremento en la captación de colesterol unido a lipoproteínas y de la biosíntesis de pregnenolona, entre otros factores.

A continuación se detallan en la Tabla 3.1.2, a modo de resumen, algunos de los pasos aldosteronogénicos regulados por ET-1 en adrenal de rata y, en los casos conocidos, el subtipo de receptor involucrado.

Tabla 3.1.2: Pasos aldosteronogénicos estimulados por ET. Receptores involucrados.*

Paso regulado	ET	$ET_{A/B}$
Biosíntesis de aldosterona	+ [91,96-99,99-104,149].	ET_B [este trabajo] [92,96,442,447,450,492]
Incorporación de colesterol	+ [este trabajo]	ET_B [este trabajo]
Movilización del colesterol intracelular	+ [98]	
Pasaje a la membrana interna mitocondrial	+ [440,492]	
Colesterol→Pregnenolona	+ [este trabajo]	ET_A [este trabajo]
Pregnenolona→Progesterona	- [este trabajo]	
11-desoxicorticosterona→aldosterona	+ [104]	
Potenciación del efecto aldosterongénico de ACTH	+ [150,151]	
Potenciación del efecto aldosterongénico de angiotensina II	+ [150]	

* Solo se dan algunas referencias bibliográficas.

Sección 2: Caracterización bioquímica de la 11β–HSD de adrenal de rata

La enzima 11β–HSD cataliza la conversión de corticosterona y cortisol en 11-dehidrocorticosterona y cortisona respectivamente. Diversos roles han sido postulados para ambas isoformas de 11β–HSD en los distintos tejidos donde se expresa (ver *Introducción*).

La presencia de actividad enzimática y/o de mRNA de 11β–HSD en la glándula adrenal es dependiente de la especie animal bajo estudio y de su estadio de desarrollo. Así, en la adrenal de humano, oveja y rata se han detectado ambas isoformas, 1 y 2, de 11β–HSD [231,234,300,310,389-394,493]. Si bién la 11β–HSD-1 tiene una expresión muy diversificada en muchos tejidos, la isoforma 2 es, en general, de expresión más restringida. Así, no resulta llamativo que el tipo 1 de la 11β–HSD se exprese en la glándula adrenal, aunque sí lo es la expresión del tipo 2.

Algunos roles fisiológicos de 11β–HSD-2 están muy bién caracterizados. Por ej.: esta isoforma proteje de los glucocorticoides al receptor de mineralocorticoides en tejidos blanco de estos últiimos esteroides como ser riñón y colon, o regula el pasaje de los glucocorticoides a través de la placenta inactivándolos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el rol fisiológico de la expresión de 11β–HSD en la glándula adrenal. Con el fin de estudiar éste último en ambos tipos de la 11β–HSD en la adrenal de rata el primer objetivo consistió en la caracterización bioquímica y cinética de ambas isoformas de 11β–HSD.

Actividad de 11β–HSD

La actividad enzimática de la 11β–HSD se determinó en microsomas de adrenal de rata. En la Fig. 3.2.1 se observa que 10 μg de proteína microsomal producen la conversión de 7.5 ± 0.6 % de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona en ausencia de cofactores. Esta reacción se ve fuertemente estimulada cuando se utiliza NAD^+ como cofactor alcanzándose valores de 20.0 ± 1.8 % de conversión de corticosterona en

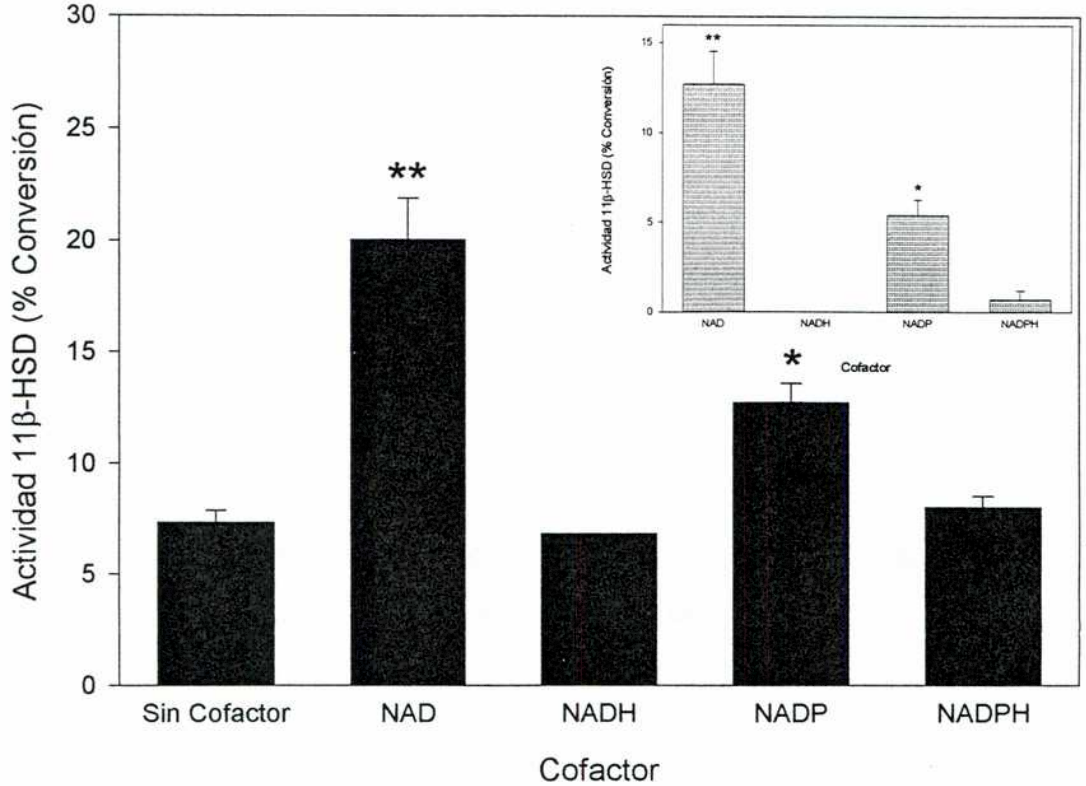


Fig. 3.2.1. Actividad de 11β-HSD en microsomas de adrenal de rata. 10 μg de proteína microsomal adrenal de rata fueron incubados con 200.000 dpm de [^{3}H]-corticosterona y 0.5 mM de los correspondientes cofactores durante 15 min a 37 C y luego se determinó la actividad de 11β-HSD que se expresa como el porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona.. En el inserto se observan los mismos datos a los que se les ha restado la actividad de 11β-HSD en ausencia de cofactor. Los valores se presentan como Media ± ES de tres experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$, con respecto a Sin Cofactor.

11-dehidrocorticosterona indicando así la presencia de la isoforma 2 de la 11β–HSD (11β–HSD-2). Alternativamente, la adición de $NADP^+$ como cofactor también produce un incremento en la conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona obteniéndose valores de 12.8 ± 0.8 %, lo cual es indicativo, en este caso, de la presencia de actividad enzimática de la isoforma 1 de 11β–HSD (11β–HSD-1). Los respectivos cofactores reducidos, NADH y NADPH, no estimularon la conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona como era de esperar debido a la necesidad de cofactores oxidados para la oxidación de los sustratos esteroideos reducidos. Particularmente llamativa resultó la actividad basal de 11β–HSD determinada en ausencia de cofactores, la que no pudo ser eliminada aún realizando varios lavados por centrifugación y

resuspensión de la fracción microsomal. Esto podría ser debido a la existencia de cofactores endógenos atrapados dentro de las vesículas formadas al obtener la fracción microsomal entre otras posibles explicaciones. Debido a que esta actividad enzimática, en ausencia de cofactores, no puede ser asignada con certeza a ninguna de las dos isoformas, en todos los estudios subsiguientes en los que se determinó la actividad enzimática de algunas de las dos isoformas de 11β–HSD mediante el uso diferencial de cofactores, los valores de actividad enzimática para cada una de las isoformas se informaron restando los valores de actividad enzimática obtenidos en ausencia de cofactores exógenos a los determinados con cada uno de los cofactores. Los valores así obtenidos se observan en el inserto de la Fig. 3.2.1. De igual forma se procedió para la determinación de la actividad de reductasa de la 11β–HSD, o sea, los valores presentados tienen restada la conversión observada en ausencia de cofactor.

Con el fin de determinar la localización de cada una de las isoformas de 11β–HSD dentro de la glándula adrenal, se realizaron incubaciones con homogenatos de las zonas glomerulosa (cápsula) y fasciculata ("core") con corticosterona y NAD^+ o $NADP^+$ como cofactores. Ambas zonas adrenales presentaron actividad de 11β–HSD-2 (determinada con NAD^+ como cofactor). Sin embargo, posteriores estudios inmunohistoquímicos demuestran que la 11β–HSD-2 sólo se halla en la región fasciculata de la adrenal de rata [392] por lo que nuestros resultados con cápsula adrenal podrían deberse a contaminación de la zona glomerulosa con células de la zona fasciculata ya que se sabe que el método de descapsulamiento utilizado para separar las zonas de la corteza de la glándula adrenal produce fracciones enriquecidas en una u otra zona. Más aún, aunque ambas zonas de la corteza adrenal muestran cierto grado de contaminación, ésta es mucho mayor en la zona glomerulosa con células de la zona fasciculata. Esto último además concordaba con el hecho que la actividad enzimática específica de 11β–HSD-2 era mayor en la zona fasciculata que en la zona glomerulosa. Por otro lado se observó actividad de 11β–HSD utilizando $NADP^+$ como cofactor lo que estaría indicando la presencia de 11β–HSD-1 en la glándula adrenal.

Cabe mencionar que al momento de realizar estos experimentos, sólo se había reportado la presencia de 11β–HSD-2 en adrenal, siendo la existencia de la 11β–HSD-1 en adrenal confirmada por otros autores, pero más recientemente [300,392]. La 11β–HSD-1, en

nuestros resultados, presentaba mayor actividad en la zona glomerulosa que en la zona fasciculata indicando que probablemente no se debía a contaminación de las distintas zonas sino que probablemente se hallase exclusivamente o en mayor concentración en la zona glomerulosa.

Luego de la detección de la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD en adrenal de rata se realizaron curvas de cantidad de proteínas y de tiempo de incubación con el fin de fijar las condiciones lineales para el ensayo de ambas actividades enzimáticas en la fracción microsomal adrenal.

Se realizaron curvas dosis-respuesta utilizando cantidades crecientes de la fracción microsomal adrenal en un rango entre 5 y 100 μg de proteína por ensayo.

La concentración elegida fue de 20 μg de proteína por ensayo, concentración adecuada para la determinacion de la actividad enzimatica en el rango lineal.

Con el uso de una concentración de 20 μg de proteína por ensayo se realizaron curvas de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona en función del tiempo de incubación. Las incubaciones se realizaron entre 0 y 22.5 min, observándose que la actividad enzimatica fue lineal en todo el rango estudiado. Se fijó un tiempo de 15 min de incubación para los posteriores ensayos de actividad de 11β–HSD.

Para determinar las concentraciones óptimas de cofactores en el ensayo de ambas isoformas de 11β–HSD, se realizaron curvas dosis-respuesta con concentraciones crecientes de cada uno de los cofactores (NAD^+ y $NADP^+$) y se determinó la actividad enzimática de 11β–HSD. Como se observa en la Fig. 3.2.2 NAD^+ y $NADP^+$ producen un incremento de la actividad enzimática de 11β–HSD en forma dosis dependiente alcanzándose respuestas máximas para ambos cofactores a concentraciones de 0.5 mM. Esta concentración de cofactor fue la utilizada en los estudios posteriores para que la concentración de cofactor no fuese un factor limitante.

Posteriormente, se realizaron incubaciones con ambos cofactores incubados simultáneamente, cada uno en una concentración de 0.5 mM. En este caso se obtuvo una actividad de 11β–HSD similar a la suma (103.2 ± 4.4 %, n= 15, NS respecto a la suma, $p < 0.01$ respecto de la actividad con NAD^+ o $NADP^+$ sólo) de las actividades enzimáticas obtenidas con cada uno de los cofactores por separado, sugiriendo la presencia de dos

enzimas diferentes y no de una sóla enzima capaz de utilizar ambos cofactores indistintamente. De esta forma, de acuerdo a todos los resultados hasta aquí obtenidos, se evidenciaría la existencia de expresión de 11β–HSD de tipo 1 y 2.

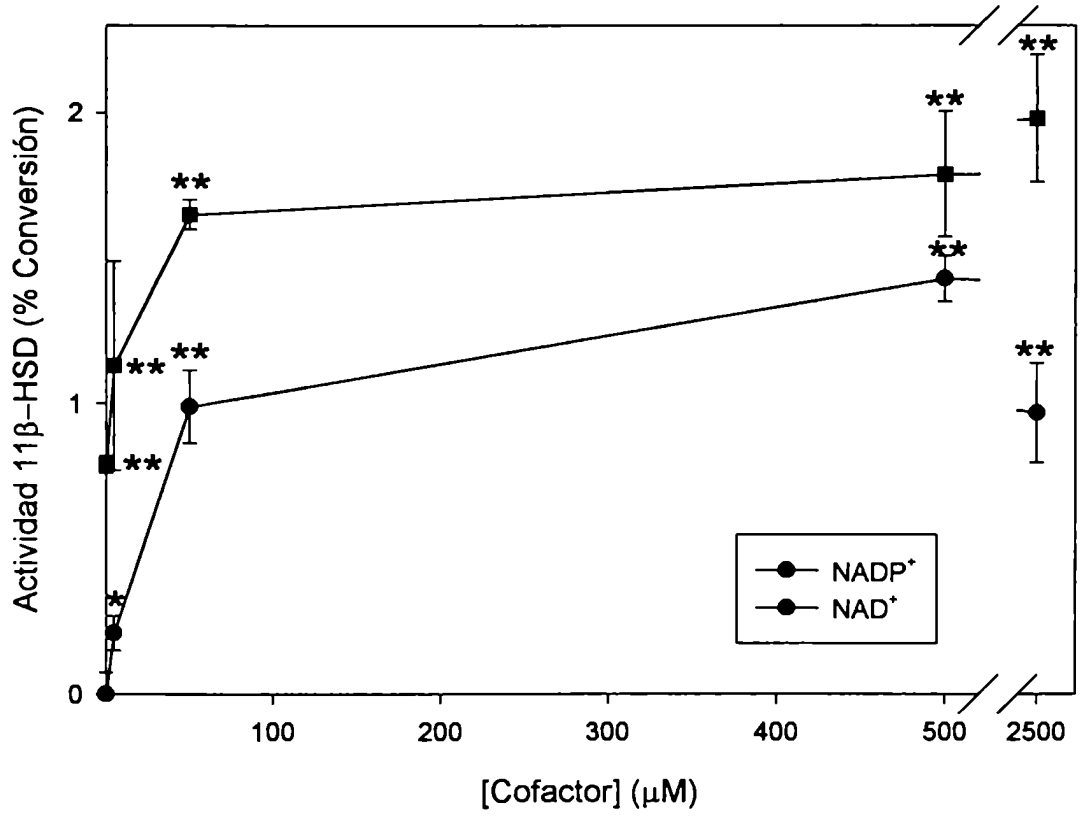


Fig. 3.2.2. Dependencia de cofactores de la actividad de 11β-HSD microsomal de adrenal de rata. 10 μg de proteína microsomal adrenal de rata fueron incubados con [^{3}H]-corticosterona y concentraciones crecientes de NAD^+ o $NADP^+$ y luego se determinó la actividad de 11β-HSD que se expresa como el porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$, respecto al valor sin el agregado de cofactor exógeno.

Estudios de reversibilidad. Efecto del pH.

Como ya se ha mencionado (ver *Introducción*) una de las características de los dos tipos de 11β–HSD es la catalización de la reacción inversa (reducción de esteroides). La reversibilidad de la reacción enzimática para ambas isoformas de 11β–HSD se estudió utilizando, según correspondiese, NAD^+ o $NADP^+$ para la determación de la actividad de deshidrogenasa o, NADH o NADPH para la actividad de reductasa. Para ello se

realizaron incubaciones con idénticas cantidades de proteína microsomal adrenal tanto para la reacción de oxidación como de reducción a distintos valores de pH dado que éste es un parámetro que afecta en forma diferencial las actividades de deshidrogenasa y reductasa [183,188,494,495].

En la Fig. 3.2.3 se observa que las actividades de deshidrogenasa y reductasa de ambas isoformas de 11β–HSD se comportan en forma inversa con respecto al pH del medio de incubación. Mientras que la actividad de deshidrogenasa (corticosterona→11-dehidrocorticosterona, panel A) se incrementa al aumentar el pH del medio de incubación en forma constante entre los valores estudiados (pH: 6 a 9), la actividad de reductasa (11-dehidrocorticosterona→corticosterona, panel B) disminuye en forma proporcional al incremento del pH del medio de incubación. En ambos casos, las dos isoformas, determinadas por el uso diferencial de cofactores, se comportan en forma similar con respecto a la influencia del pH del medio de incubación. Ambos paneles del gráfico se hallan representados utilizando la misma escala con el fin de hacer notar la diferencia de magnitud de las actividades enzimáticas de deshidrogenasa y reductasa.

La isoforma de tipo 1, dependiente de $NADP^+$/NADPH, presenta una significativa

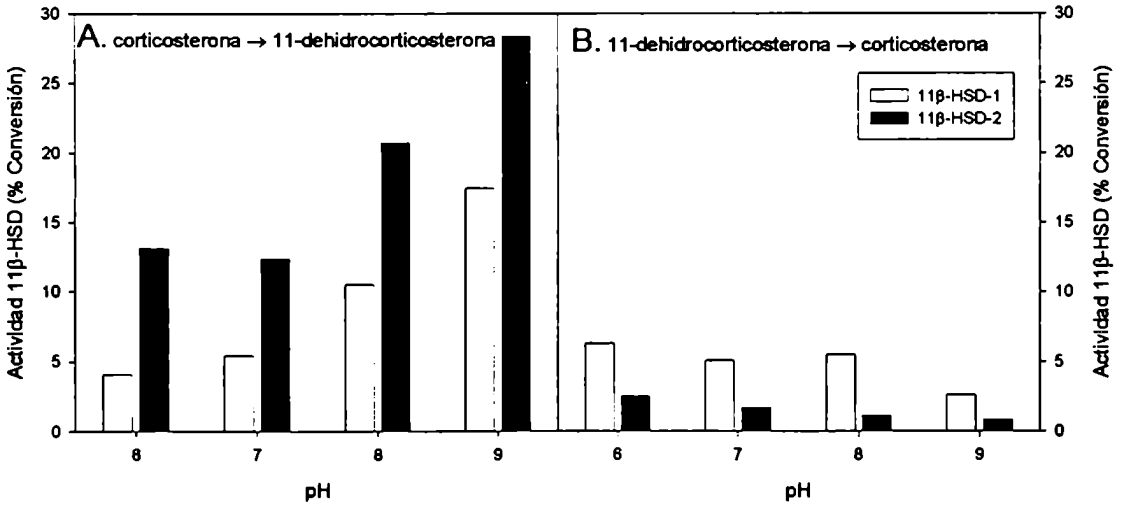


Fig. 3.2.3. Dependencia del pH del medio de incubación en las actividades de oxidasa y reductasa de la 11β-HSD. 50 μg de proteína microsomal adrenal de rata fueron incubados con [^{3}H]-corticosterona (panel A) o [^{3}H]-11-dehidrocorticosterona (panel B) a distintos valores de pH y posteriormente se determinó la actividad de 11β-HSD que se expresa como porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona.

reversibilidad de la reacción, obteniéndose un porcentaje de transformación del 17.5 % para la actividad de deshidrogenasa a pH 9 y para la actividad de reductasa un porcentaje de transformación de 6.3 % a pH 6 (Fig. 3.2.3). Esto indicaria que ambas actividades enzimáticas se hallan dentro del mismo orden de magnitud para esta isoforma. La isoforma tipo 2, dependiente de NAD^+/NADH, presenta una actividad de deshidrogenasa mucho mayor que la isoforma tipo 1, observándose un porcentaje máximo de transformación de 28.4 % a pH 9. La actividad de reductasa de 11β–HSD-2 sólo alcanza un valor del 2.6 % como porcentaje máximo de transformación a pH 6 (Fig. 3.2.3). Estos resultados indican que la 11β–HSD-2 se comporta esencialmente como una deshidrogenasa.

Parámetros cinéticos

Los valores de K_m para los sustratos esteroideos es un parámetro diferencial de ambas isoformas de 11β–HSD [181,186,188]. En efecto, mientras la 11β–HSD-1 presenta valores de K_m en el rango micromolar, la 11β–HSD-2 los presenta en el rango nanomolar. Esta diferencia en los valores de K_m estaría fuertemente relacionada a las distintas funciones fisiológicas de ambas isoformas. Con este fin, se determinaron los parámetros cinéticos para ambas isoformas de 11β–HSD en microsomas lavados de adrenal de rata. En la Fig. 3.2.4 se muestran las curvas de V_i en función de la concentración de sustrato para cada una de las isoformas y los parámetros cinéticos determinados se hallan resumidos en la Tabla 3.2.1

Tabla 3.2.1: Parametros cinéticos de la actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD microsomal adrenal.

Isoforma	K_m ap. (nM)	$V_{máx}$ ap. (pmoles A/min . mg proteína)
11β–HSD-1	5112 ± 410	237 ± 32
11β–HSD-2	34.7 ± 8.3	10.6 ± 4.8

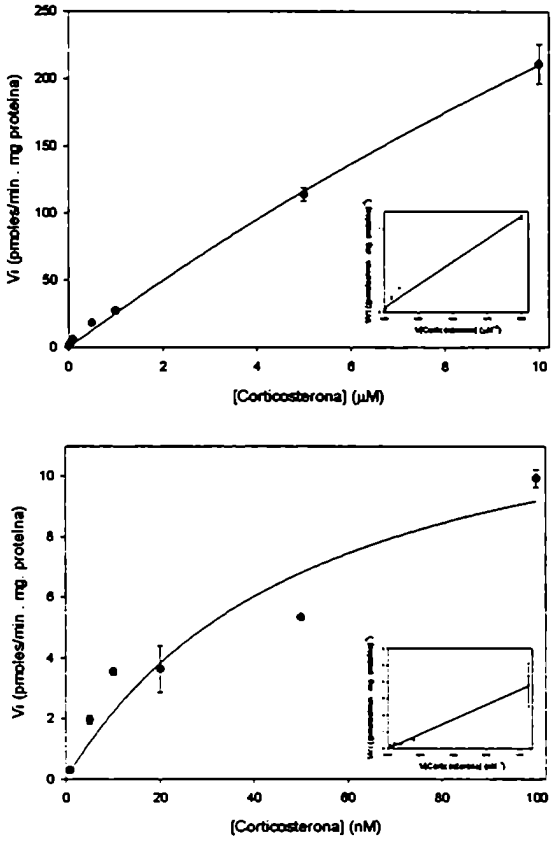


Fig. 3.2.4. Análisis cinético de ambas isoformas de 11β-HSD. 25 μg de proteína microsomal adrenal de rata fueron incubados con concentraciones crecientes de [^{3}H]-corticosterona y 0.5 mM $NADP^+$ (11β-HSD-1, panel A) o NAD^+ (11β-HSD-2, panel B) y posteriormente se determinó la actividad de 11β-HSD. En los insertos se presentan las representaciones de Lineweaver-Burk para cada isoforma de 11β-HSD. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Los resultados obtenidos muestran que ambas isoformas 1 y 2 de la 11β-HSD de adrenal de rata presentan valores en el rango micromolar y nanomolar respectivamente; en concordancia con los resultados obtenidos en otros órganos de rata y otras especies [188,192,201,230,231,234,236,292,312,496-501].

Inhibición por producto

La 11β–HSD-2 presenta inhibición significativa por el producto de la reacción de deshidrogenación, la 11-dehidrocorticosterona o la cortisona, al contrario de lo observado con la isoforma 1 [181,186,188].

La inhibición de la actividad de deshidrogenasa de ambas isoformas de 11β–HSD por el producto de esta reacción fue estudiada realizando curvas dosis-respuesta de la actividad enzimática de 11β–HSD en función de concentraciones crecientes de 11-dehidrocorticosterona. Valores de IC_{50} de 9.3 μM y 0.186 μM fueron obtenidos para las isoformas 1 y 2 de la 11β–HSD respectivamente (Tabla 3.2.2). La 11β–HSD-2 fue más de 50 veces más sensible que la 11β–HSD-1 a la inhibición por producto.

Estudios de inhibicion de la actividad de 11β–HSD.

11αOH-progesterona y ácido glicirretínico son dos potentes inhibidores de la 11β–HSD [201,202,224,242,279,292,498,499]. Con el fin de estudiar la respuesta de ambas isoformas de la 11β–HSD de adrenal de rata frente a estos compuestos se realizaron curvas dosis-respuesta de la actividad enzimática de 11β–HSD en función de concentraciones crecientes de ambos inhibidores y se determinaron las IC_{50} para cada tipo de 11β–HSD como se resume en la Tabla 3.2.2.

Tabla 3.2.2: Inhibición de 11β–HSD por distintos compuestos.

Inhibidor	IC_{50}	
	11β–HSD-1	11β–HSD-2
11-dehidrocorticosterona	9.3 μM	0.186 μM
11αOH-Progesterona	3.7 nM	0.93 nM
Ácido glicirretínico	0.017 nM	2.09 nM

El ácido glicirrefínico fue el inhibidor más potente para la 11β–HSD-1 mientras que 11αOH-progesterona lo fue para la 11β–HSD-2. 11αOH-progesterona fue 4 veces más efectivo como inhibidor de la 11β–HSD-2 que de la 11β–HSD-1 mientras que el ácido glicirretínico fue más de 100 veces más potente con la 11β–HSD-1 frente a la 11β–HSD-2.

Distribución subcelular

La distribución subcelular de ambas isoformas de la 11β–HSD fué estudiada en homogenatos de adrenal de rata. La eficiencia del fraccionamiento subcelular utilizado se determinó midiendo enzimas marcadoras de las distintas fracciones subcelulares obtenidas. Una vez realizado el fraccionamiento del homogenato, la fracción nuclear fue purificada mediante centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa.

La Fig. 3.2.5 muestra que ambas isoformas de 11β–HSD se hallan preferencialmente en la fracción microsomal, obteniéndose un 71 % y 92 % de la actividad total en las

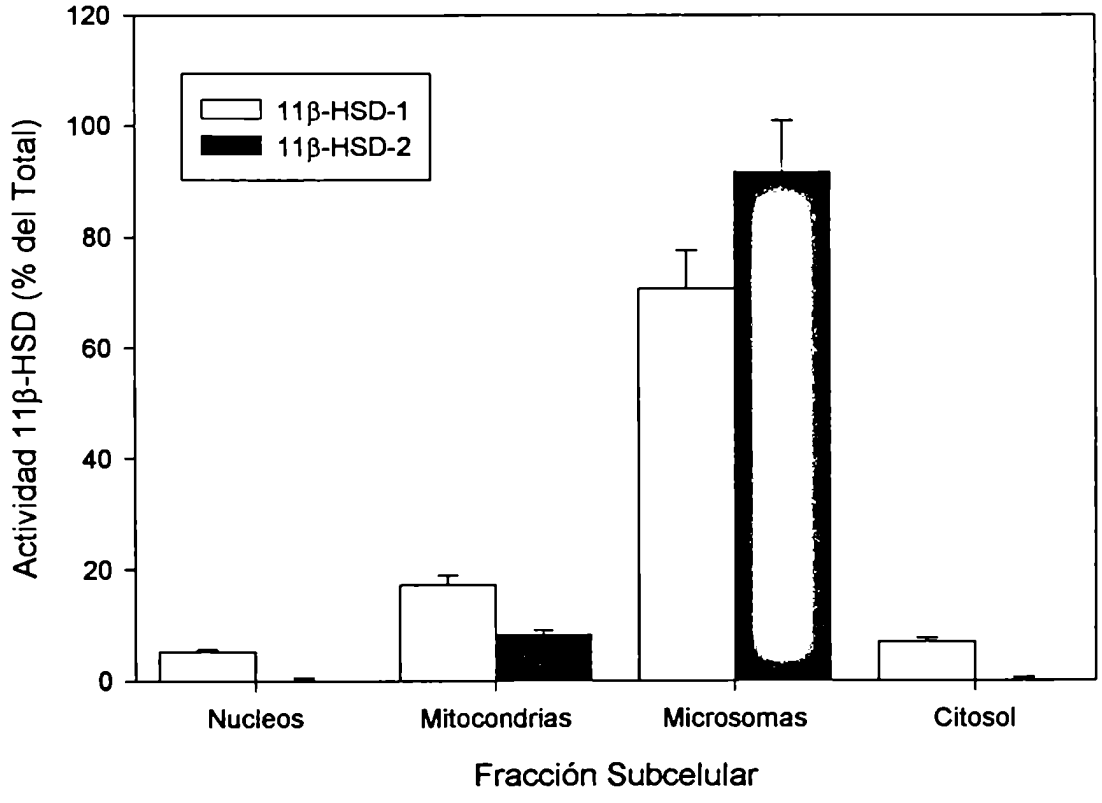


Fig. 3.2.5. Distribución subcelular de ambas isoformas de la 11β-HSD en adrenal de rata. Las adrenales se extrajeron, limpiaron y homogeneizaron. Las fracciones subcelulares fueron obtenidas por centrifugación diferencial. La fracción nuclear fue purificada mediante colchones de sacarosa como se detalla en *Materiales y Métodos*. 25 µg de proteína fueron ensayados para la determinación de la actividad de 11β-HSD. Los resultados se presentan como el porcentaje de actividad de cada isoforma de 11β-HSD respecto del total hallado en todas las fracciones. Los valores se presentan como Media ± ES de tres experimentos realizados por duplicado.

distintas fracciones para 11β–HSD-1 y 11β–HSD-2 respectivamente, seguida por la fracción mitocondrial (17 % y 8 %). Sólo para 11β–HSD-1 se halló una pequeña fracción de su actividad en la fracción nuclear y en el citosol reflejando probablemente o una distribución diferente de la 11β-HSD-2 o una contaminación con las otras fracciones por goteo, entre otras posibilidades.

Discusión

Las características bioquímicas distintivas más sobresalientes de ambas isoformas de la 11β–HSD son el requerimiento diferencial de cofactores, la reversibilidad de la reacción catalizada y su afinidad por el sustrato[181,186-188]. En esta sección, en base a estos y otros parámetros se demuestra la presencia de actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD en la adrenal de rata, lo cual era desconocido en los comienzos de este estudio y es concordante con otros estudios posteriores [392]. Sin embargo, en adrenal de oveja no se observó la presencia de mRNA de 11β–HSD-1 mediante hibridización *in situ* o Northern-blot aunque sí se observó para la 11β-HSD-2 [197,502].

La adición de los cofactores NAD^+ y $NADP^+$ incrementó la actividad de deshidrogenasa en forma dosis dependiente lo cual es compatible con la presencia de ambas isoformas de 11β–HSD (Fig. 3.2.2). Esto es apoyado por el hecho de que cuando se realizaron incubaciones con ambos cofactores simultáneamente (ver Resultados) se obtuvo un valor de actividad enzimática semejante a la suma de las actividades enzimáticas de cada una de las isoformas por separado.

Las actividades de deshidrogenasa y reductasa son afectadas en ambas isoformas por el pH del medio de incubación (Fig. 3.2.3). La actividad de deshidrogenasa se incrementa al aumentar el pH del medio de incubación en ambas isoformas (Fig. 3.2.3-A). En forma contraria, la actividad de reductasa de ambas isoformas se incrementa al disminuir el pH del medio (Fig. 3.2.3-B). Resultados similares de dependencia del pH del medio de incubación han sido informados para la actividad de 11β–HSD de otras fuentes [183,188,494,495]. Si se considera que los productos involucrados en la reacción incluyen no sólo al esteroide sino además al protón como se muestra en la siguiente fórmula:

$$Esteroide - reducido + NAD^+ \xleftrightarrow{11\beta-HSD} Esteroide - oxidado + NADH + H^+$$

Es fácil observar que el protón es un producto más y al incrementarse su concentración (bajo pH) dirigirá el equilibrio hacia la izquierda disminuyendo la actividad de deshidrogenasa como fue observado con los microsomas de adrenal de rata. En forma contraria, altas concentraciones de protones incrementarán la actividad de reductasa.

Comparando los valores máximos obtenidos para cada una de las actividades enzimáticas de ambas isoformas se obtiene un coeficiente *de actividad de deshidrogensa (pH: 9)/actividad de reductasa (pH: 6)* de 2.7 y 10.9 para las isoformas 1 y 2 respectivamente; mientras que a pH 7 para ambas actividades dicha relación asume los valores de 1.07 y 7.24 para 11β–HSD-1 y 11β–HSD-2, respectivamente. Estos resultados indican que mientras la isoforma 1 cataliza en una extensión similar ambos tipos de reacciones, oxidación y reducción, la isoforma 2 cataliza esencialmente la oxidación.

Estos resultados confirman otros obtenidos en otros sistemas. En efecto, las isoformas 1 y 2 son denominadas reversible e irreversible respectivamente. Esto ha quedado claramente demostrado en experimentos realizados *in vivo* con células aisladas purificadas que expresan exclusivamente una isoforma de 11β–HSD [224,227,293] o en células transfectadas con los cDNA correspondientes [193,230,231,234,236,503]. En estos casos la 11β–HSD-1 se comporta en forma reversible aunque funciona preferencialmente como una reductasa (11-dehidrocorticosterona→corticosterona) mientras que la 11β–HSD-2 se comporta en forma "casi" irreversible como una deshidrogenasa (corticosterona →11-dehidrocorticosterona). La 11β–HSD-2 presenta una actividad de deshidrogenasa de un órden de magnitud superior a la actividad de reductasa por lo que en comparación con la 11β–HSD-1 ha sido denominada "irreversible". Sin embargo, la 11β–HSD-2 presenta actividad de reductasa, aunque muy pequeña, en otros sistemas [500,503] como también se observa en el presente trabajo en adrenal de rata (Fig. 3.2.3-B).

Por otro lado, si bién la 11β–HSD-1 funciona preferencialmente como una reductasa *in vivo* [183,188,293], cuando se rompe la estructura celular y se trabaja con homogenatos o fracciones celulares disminuye la actividad de reductasa debido a que esta actividad es

mucho más lábil que la actividad de deshidrogenasa. En efecto, en un principio se desconocía si ambas actividades enzimáticas residían en la misma proteína o se hallaban en proteínas distintas. Cuando Lakshmi V. y Monder C. [192,504,505] purificaron por primera vez la 11β–HSD-1 de hígado de rata perdieron en los primeros pasos de purificación la actividad de reductasa lo que llevó a que durante varios años se pensase que las actividades enzimáticas se hallaban en péptidos distintos. Finalmente, esta idea fue descartada debido a los infructuosos intentos por aislar la actividad de reductasa de la 11β-HSD-1 y a que al ser clonado y expresado su cDNA se observó que un único polipéptido contenía ambas actividades enzimáticas. Por lo tanto, la determinación de la actividad de reductasa para la 11β–HSD-1 está subvalorada debido a la labilidad de dicha actividad de esta enzima.

Otro de los parámetros distintivos de las isoformas de 11β–HSD es su afinidad por el sustrato. Mientras la 11β–HSD-1 presenta un K_m en el rango micromolar, la 11β–HSD-2 lo presenta en el rango nanomolar. En la adrenal de rata se observa que la 11β–HSD-1 presentó un valor de K_m aparente en el rango micromolar para corticosterona como el reportado por otros autores en rata [192,496] y en otras especies [312,497]. Por otro lado, la 11β–HSD-2 adrenal presentó un valor de K_m aparente en el rango nanomolar para corticosterona similar al reportado en rata [188,234] y en otras especies estudiadas [201,230,231,236,292,498-501].

El efecto inhibitorio de la actividad de 11β–HSD por 11-dehidrocorticosterona, 11αOH-progesterona y ácido glicirretínico fué también estudiado en ambas isoformas de esta enzima adrenal.

Los derivados 11-hidroxilados de la progesterona, la 11αOH-progesterona (11αOH-P) y la 11βOH-progesterona (11βOH-P) son potentes inhibidores de ambas isoformas de 11β–HSD *in vitro* [202,242,292,494,498] e *in vivo* [279,292,494]. La 11αOH-P es aproximadamente 10 veces más potente inhibidor de la 11β–HSD-2 que la 11βOH-P [292,498]. 11αOH-P y 11βOH-P confieren efectos mineralocorticoideos sobre corticosterona en ratas adrenalectomizadas disminuyendo la excresión de sodio y aumentando la excresión de potasio [292,494], incrementando así la presión arterial a través de los receptores de mineralocorticoides [279]. Todos estos efectos *in vivo* serían

producidos a través de la inhibición de la 11β–HSD-2 lo que llevaría a un efecto mineralocorticoide de los glucocorticoides ya que no ocurren en ratas adrenalectomizadas (sin corticosterona endógena y sin terapia de reemplazo) y se restaura el efecto al administrar corticosterona exógena a los animales.

La 11βOH-P es sustrato de la 11β–HSD-1 y junto con su derivado 11-oxidado (11-cetoprogesterona) formaría un nuevo par de sustratos de la 11β–HSD-1 como lo son corticosterona/11-dehidrocorticosterona y cortisol/cortisona [494]. Se desconoce si 11βOH-P es sustrato de la 11β–HSD-2. La 11αOH-P es un inhibidor competitivo de la 11β–HSD-2 sugiriendo que podría ser sustrato de esta enzima [242].

En microsomas de adrenal de rata la 11αOH-P inhibió a la 11β–HSD-1 con un IC_{50} de 3.7 nM inferior a los valores reportados por otros autores en otros sistemas. En microsomas de hígado de rata se han reportado valores de IC_{50} de 1 μM [292,498] y de Ki de 11.8 μM [494]. Respecto de la 11β–HSD-2 el valor de IC_{50} para adrenal de rata (0.93 nM) es similar al reportado Morita H. *et al.* [242] de 0.9 nM para 11αOH-P en microsomas de células transfectadas con la 11β–HSD-2 de rata. Valores más elevados de IC_{50} para 11αOH-P han sido informados en otros sistemas como lisados de líneas celulares de coriocarcinoma humano JEG-3 (140 nM) [292] y en microsomas de riñón de oveja (100 nM) [498].

La 11αOH-P no es un metabolito endógeno ya que no se ha demostrado ni su síntesis ni la existencia de una enzima con actividad de 11α-hidroxilasa requerida para su biosíntesis. Por otro lado no pudo ser detectada en orina de mamíferos [242]. Sin embargo, 11αOH-P podría ser el producto de bacterias de la flora intestinal y poseer importancia fisiológica. 11βOH-P, aunque menos potente como inhibidor, es producido por la glándula adrenal bajo ciertas condiciones clínicas como ser por ej. deficiencia de la 17-hidroxilasa [188,506], y se ha demostrado su síntesis en tejidos vasculares [507].

El ácido glicirretínicô fue el primer inhibidor específico de la 11β–HSD descripto [183,282,495]. La semejanza del efecto fisiológico de la administración de ácido glicirretínico y el Síndrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoide llevó a la dilucidación del mecanismo molecular de este último (ver *Introducción*). El ácido

glicirretínico produce una inhibición reversible de la actividad de deshidrogenasa de la 11β–HSD-1 [193,202] y de la 11β–HSD-2 [201,202,230,234,282,499].

La 11β–HSD-1 fue más de 100 veces más sensible a la acción inhibitoria del ácido glicirretínico sobre su actividad con respecto a la 11β–HSD-2 (IC_{50}= 0.017 nM vs. IC_{50}= 2.09 nM). La 11β–HSD-2 de microsomas de adrenal de rata presentó un valor de IC_{50}: 2.09 nM, levemente menor al reportado por otros autores en homogenatos de células transfectadas con el cDNA de esta enzima también de rata (IC_{50}= 15 nM [242], IC_{50}= 80 nM [503]) o de humano (IC_{50}= 8-11 nM [201,499]).

La 11-dehidrocorticosterona es el producto de la deshidrogenación de la corticosterona aunque hay que recordar que también es sustrato de la reacción inversa, especialmente de la 11β–HSD-1, y muy probablemente con mayor afinidad por esta isoforma ya que funciona preferencialmente como una reductasa. En general se acepta que la 11-dehidrocorticosterona presenta un efecto diferencial respecto de las isoformas de 11β–HSD, produciendo inhibición por producto sólo de la 11β–HSD-2. En efecto, la 11-dehidrocorticosterona fue 50 veces más potente como inhibidor de la 11β–HSD-2 que de la isoforma 1. El valor de IC_{50} obtenido para 11β–HSD-2 es muy similar al reportado para la enzima clonada de rata expresada en células CHOP (200 nM) [242] y 2-5 veces menor al reportado para microsomas de riñón de oveja (IC_{50}= 0.2-0.5 μM) [508], homogenatos de células transfectadas con la 11β–HSD-2 humana (IC_{50}= 1 μM) [230] o células corticales de riñón de conejo ($IC_{50} \cong$ 1 μM) [509].

Altas concentraciones de 11-dehidrocorticosterona también producen inhibición de la 11β–HSD-1 como se ha observado en microsomas de hígado de oveja donde la 11β–HSD-1 es algo más de 100 veces menos sensible a la inhibición por 11-dehidrocorticosterona que la 11β–HSD-2 [508]. En adrenal de rata la 11β–HSD-1 presentó un IC_{50} de 9.3 μM.

La distribución subcelular de ambas isoformas de 11β–HSD mostró que en adrenal de rata se hallan principalmente en la fracción microsomal (70 y 92 % del total para las isoformas 1 y 2 respectivamente), seguido por una fracción menor de la actividad total en la fracción mitocondrial (17 y 8 %).

Mientras la 11β–HSD-1 parecería localizarse casi exclusivamente en la fracción microsomal [183,191], la localización subcelular de la 11β–HSD-2 es aún motivo de controversia. La 11β–HSD-2 es una enzima integral de membrana dado que sólo se halla una mínima fracción residual en el citosol y no es extraible de las membranas por tratamientos con NaCl [228,229]. El análisis de hidrofobicidad indica la presencia de tres posibles regiones transmembrana en su extremo N-terminal [230,231,236,499]. En los fraccionamientos celulares se ha reportado la presencia de actividad de 11β–HSD-2 en la fracción nuclear [242]. En concordancia con esto último, se ha observado mediante microscopía confocal la localización nuclear y citoplasmática (retículo endoplasmático) de la 11β–HSD-2 en células corticales y de colon humanas [202,239]. Sin embargo, otros autores trabajando con proteínas de fusión entre 11β–HSD-2 y GFP ("Green Fluorescent Protein") y microscopía confocal han localizado a la 11β–HSD-2 en el retículo endoplasmático y en la membrana externa de la envoltura nuclear de células CHO y de nefrón distal (MDCK) transfectadas con la construcción. Estos últimos resultados indicarían que la 11β–HSD-2 se localiza en el retículo endoplasmático que se continúa con la membrana nuclear externa [186,237,238].

Los resultados presentados en esta sección indicarían que la glándula adrenal de rata posee actividades enzimáticas de las isoformas 1 y 2 de la 11β–HSD. Ambas isoformas tendrían un comportamiento clásico correspondiente a las denominadas isoformas tipo 1 ("Hígado") y tipo 2 ("Riñón"). Recientemente ha sido descripta la posible existencia de una tercer isoforma de 11β–HSD (11β–HSD-3). La 11β–HSD-3 sería una enzima de alta afinidad, $NADP^+$ dependiente e irreversible. Su presencia ha sido descripta en microsomas de riñón de oveja [510] con valores de K_m de 4 y 35 nM para corticosterona y cortisol respectivamente, y un subtipo similar se hallaría en células de Leydig de rata [370] y posiblemente en células de granulosa humana [364].

En adrenal de rata parecería no hallarse una posible 11β–HSD-3 ya que la actividad enzimática dependiente de $NADP^+$ fue de baja afinidad (K_m en el rango micromolar) y reversible; características de la 11β–HSD-1. Sin embargo, no sería extraño hallar más isoformas de 11β–HSD ya que para otros miembros de la familia de la SDR ("short chain dehydrogenase/reductase", deshidrogenasas/reductasas de cadena corta) como la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa se han descripto 6 isoformas [341,511]. Las

posibles nuevas isoformas deberían ser del tipo de baja afinidad-irreversibles ya que, al menos en el ratón, el animal carente ("knock-out") de la 11β–HSD-1 no presentó actividad de 11-reductasa indicando que esta isoforma sería la única encargada de la conversión de 11-dehidrocorticosterona en corticosterona [207].

El rol de la 11β–HSD en adrenal es aún desconocido. Shimojo M. *et al.* [392] han postulado que dado que la expresión de 11β–HSD-1 es particularmente importante en el límite cortico-medular adrenal y debido a que la síntesis por la glándual adrenal de catecolaminas requiere altas concentraciones de glucocorticoides, la 11β–HSD-1 podría actuar como reductasa incrementando los niveles de glucocorticoides activos que alcanzan la médula -recordar que el flujo sanguíneo en la adrenal es centrípeto-. De esta forma, la 11β–HSD-1 incrementaría la concentración de glucocorticoides y permitiría el manteniemiento de la síntesis de catecolaminas. El rol de la 11β–HSD-2 en la adrenal también es desconocido. En la próxima sección se muestran estudios tendientes a establecer un posible rol de la 11β–HSD en la regulación de la esteroidogénesis adrenal.

Sección 3: Regulación de la 11β–HSD adrenal por ACTH – En busca de un posible rol fisiológico.

Una vez determinada la presencia y caracterización de ambas isoformas de 11β–HSD en adrenal de rata se procedió a estudiar su rol fisiológico. Los estudios se centraron en la zona fasciculata-reticularis de la glándula adrenal. Se investigó el efecto de ACTH, hormona principal de la regulación de la corticosteroidogénesis adrenal, sobre la actividad de la 11β–HSD en una serie de modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* estudiados fueron: a) estimulaciones agudas con ACTH en infusiones de 30 min y b) estimulaciones crónicas con ACTH durante 48 hs. *In vitro* se utilizó un modelo de células dispersas de fasciculata adrenal de rata estimulada en forma aguda con ACTH. También se realizaron estudios en los que se evaluó el efecto de inhibidores de la 11β–HSD en la corticosteroidogénesis *in vitro*.

Efecto agudo de ACTH *in vivo*

Se estudió el efecto del tratamiento agudo *in vivo* con ACTH sobre la actividad enzimática de 11β–HSD. Para ello, las ratas fueron infundidas durante 30 min con ACTH, las glándulas adrenales fueron extraídas, homegeneizadas y obtenida la fracción microsomal por centrifugación diferencial del homogenato. La fracción microsomal fue lavada 2 veces para eliminar el sustrato endógeno y posteriormente utilizada para la determinación de la actividad de 11β–HSD. En la Fig. 3.3.1 se observa la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD en microsomas adrenales de animales infundidos con ACTH. La actividad enzimática de ambas isoformas de HSD mostró una disminución con respecto a los controles; 11β–HSD-1 y 11β–HSD-2 mostraron una actividad del 37.1 % y 27.9 % del control respectivamente. Como control de la acción de ACTH se determinaron los valores de corticosterona intraadrenal. ACTH provocó un importante incremento de la esteroidogénesis adrenal obteniéndose valores de corticosterona intraadrenal citosólica de 125 ± 15 ng/2 adrenales y de 3012 ± 388 ng/2 adrenales para los animales controles y tratados con ACTH respectivamente ($p < 0.01$, $n = 3$).

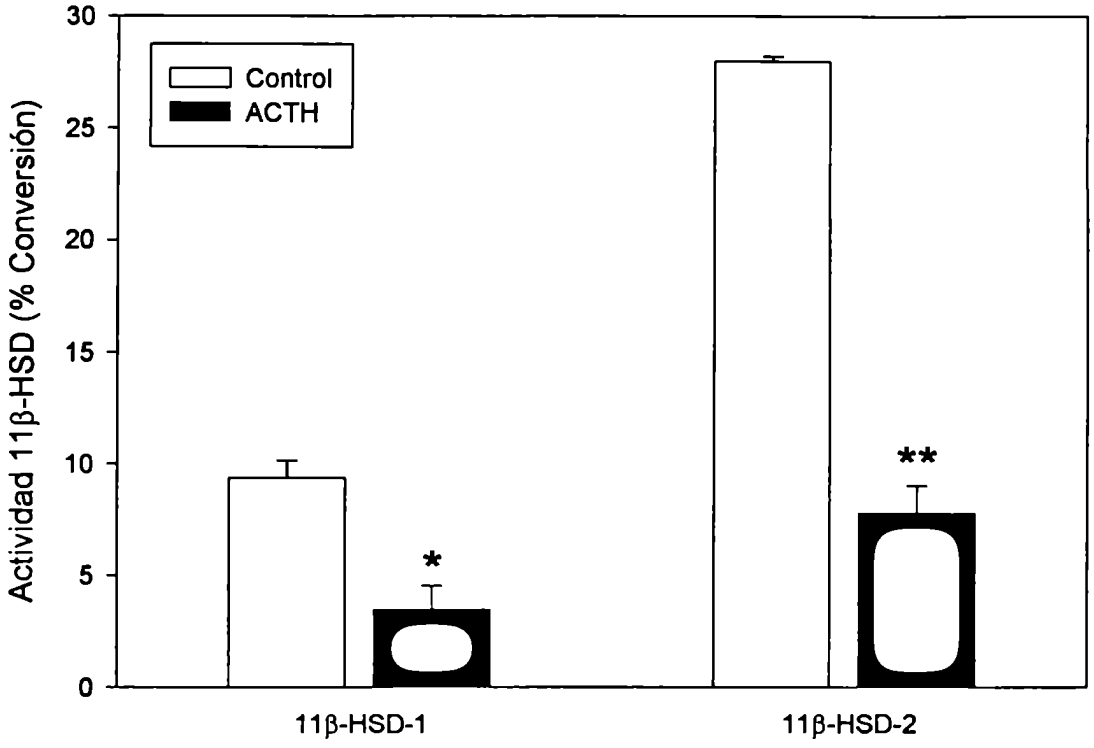


Fig. 3.3.1. Efecto del tratamiento agudo *in vivo* con ACTH en la actividad de 11β-HSD adrenal. Se infundieron ratas con ACTH (280 ng/kg.min) o vehículo durante 30 min, se extrajeron las adrenales y se obtuvo la fracción microsomal. Se incubaron 20 μg de proteína microsomal con [^{3}H]-corticosterona y se determinó la actividad de 11β-HSD que se expresa como el porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona. Los valores se presentan como Media ± ES de tres experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ACTH respecto del Control.

Para descartar posibles errores en la determinación de la actividad enzimática de 11β–HSD debido a la dilución isotópica del sustrato marcado causado por el incremento de los niveles intraadrenales de corticosterona producidos por ACTH, se determinaron los niveles de corticosterona en la fracción microsomal lavada utilizada para los ensayos enzimáticos. Para ello, los esteroides de la fracción microsomal fueron extraidos, concentrados y los niveles de corticosterona determinados por RIA. Los valores de corticosterona intramicrosomal hallados fueron de 4.79 ± 1.57 ng/2 adrenales y 6.33 ± 1.34 ng/2 adrenales para los animales controles y tratados con ACTH respectivamente (p= 0.6 (NS), n= 3). Estos resultados demostrarían que no existen diferencias significativas en el contenido endógeno microsomal de corticosterona indicando que

muy probablemente la modificación en la actividad de 11β–HSD causada por ACTH no sea debida una dilución isotópica del sustrato radioactivo con el sustrato endógeno.

Validación de la medición de corticosterona intraadrenal

La determinación de los niveles intraadrenales de corticosterona es equivalente a su determinación en plasma como se demuestra a continuación. Un lote de 18 ratas controles y tratadas con ACTH durante 1 y 24 hs fueron utilizadas para la determinación de sus valores de corticosterona plasmática e intraadrenal citosólica por RIA. En la Fig. 3.3.2 se observa la correlación entre estas dos variables que arrojó un coeficiente de correlación de ρ de Spearman de 0.0538 (p= 0.021) indicando que ambas variables se

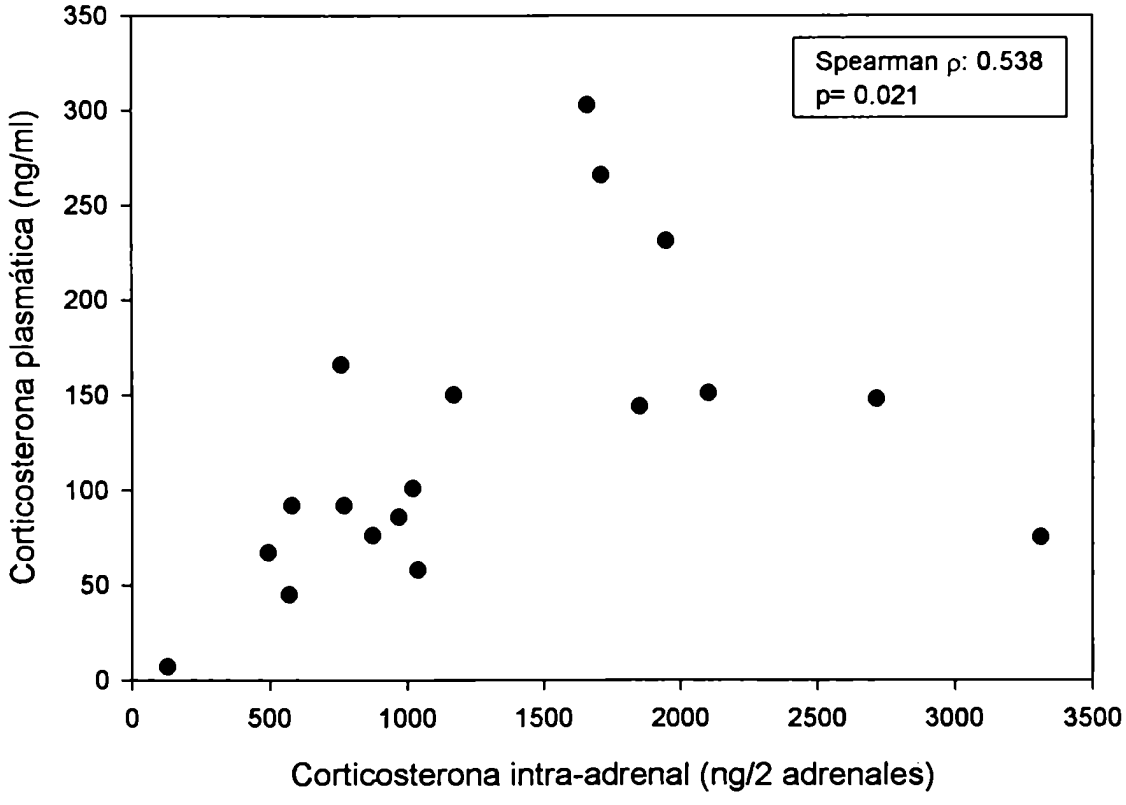


Fig. 3.3.2. Correlación entre los niveles de corticosterona plasmática e intra-adrenal citosólica. Se trataron ratas con ACTH (5 UI ACTH/día, im) durante 1-24 hs, se extrajo sangre por punción cardíaca y las glándulas adrenales. La sangre se incubó a 37 C y se obtuvo el suero. Las adrenales fueron limpiadas, homogeneizadas y se obtuvo la fracción del sobrenadante postmitocondrial por centrifugación. Se determinaron las concentraciones de corticosterona en suero y en los sobrenadantes por RIA. Se determinó el coeficiente de correlación ρ de Spearman (n= 18).

hallan estrechamente correlacionadas y que es factible el uso de la concentración intraadrenal de corticosterona como parámetro de la función adrenal.

Efecto crónico de ACTH *in vivo*

El efecto crónico de ACTH fué estudiado sobre la actividad enzimática, y los niveles proteícos y de mRNA de la 11β–HSD-2. Para ello, las ratas se trataron durante 48 hs con ACTH (1 inyección diaria de 5 UI ACTH y 2 UI de ACTH-gel). Luego se extrajeron las adrenales, se homogeneizaron y se realizaron las determinaciones antes mencionadas.

Para evaluar el efecto crónico de ACTH se determinaron parámetros fisiológicos y anatómicos que son alterados por esta hormona como ser la concentración sérica de corticosterona, el peso de la glándula adrenal y el peso del timo (Tabla 3.3.1). Luego de 48 hs de tratamiento con ACTH no se observan diferencias en los niveles séricos de corticosterona con respecto a los animales controles. El peso de la glándula adrenal mostró un incremento del 13 % en los animales tratados con ACTH debido al efecto hipertrófico de esta hormona. Por otro lado, ACTH causó efecto timolítico evidenciado por una reducción del 22 % en el peso del timo de los animales tratados.

Tabla 3.3.1: Efecto crónico de ACTH en parámetros fisiológicos y anatómicos y actividad de 11β–HSD-2.

Tratamiento	Corticosterona sérica (ng/ml)	Peso adrenal (mg)	Peso timo (mg)	Act. enzimática 11β–HSD-2 (Trat./Control)
Control	109 ± 27	18.6 ± 0.8	541 ± 37	1.00 ± 0.06
ACTH	92 ± 17 (ns)	21.1 ± 1.1 (p<0.01)	421 ± 23 (p<0.03)	3.52 ± 0.18 (p<0.01)

Las ratas se inyectaron con 5 UI ACTH y 2 UI ACTH-Gel a las 0 y 24 hs. A las 48 hs se sacrificaron y se determinó la concentración sérica de corticosterona, se pesaron las adrenales y el timo y, se determinó la actividad enzimática de la 11β–HSD-2 en la fracción microsomal adrenal.

La actividad enzimática de 11β–HSD-2 de microsomas de fasciculata adrenal de animales tratados crónicamente con ACTH mostró un incremento de más de 3.5 veces con respecto a los controles. En base a estos resultados, se procedió a estudiar los niveles intraadrenales proteicos y de mRNA de 11β–HSD-2 mediante las técnicas de Western y Northern-blot con el fin de determinar a qué nivel ocurre la regulación de la 11β–HSD-2. En la Fig.3.3.3 se observa que el tratamiento crónico con ACTH no modifica los niveles de mRNA de 11β–HSD-2 con respecto a los animales tratados con vehículo, como así tampoco con respecto a los animales no tratados.

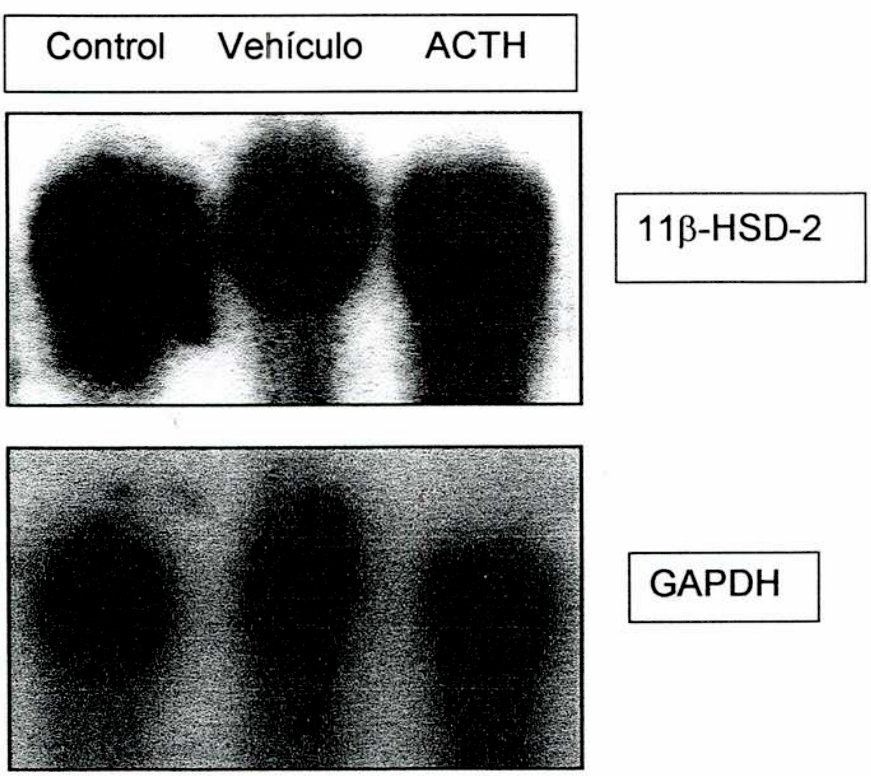


Fig 3.3.3. Efecto del tratamiento crónico *in vivo* con ACTH en los niveles de mRNA de la 11β-HSD-2 en adrenal de rata. Se trataron ratas con ACTH (5 UI ACTH/día, *i.m.* y 2 UI ACTH-GEL/día, *i.m.*) durante 48 hs, se extrajo el RNA total de las glándulas adrenales y se analizó mediante la técnica de Northern-blot utilizando como sonda el cDNA de la 11β-HSD-2 de rata. Calle 1: Animales sin tratar, calle 2: Animales tratados con solución fisiológica, calle 3: Animales tratados con ACTH. Panel inferior: La misma membrana fue lavada y re-analizada utilizando como sonda el cDNA de GAPDH.

El tratamiento crónico con ACTH produce un aumento en los niveles proteicos de 11β–HSD-2 analizados mediante la técnica de Western-blot. En la Fig. 3.3.4 se observa un incremento del 48 % en los niveles proteicos de 11β–HSD-2 en los animales tratados con respecto a los controles, determinado en unidades arbitrarias por scanneo y densitometria de la autoradiografia.

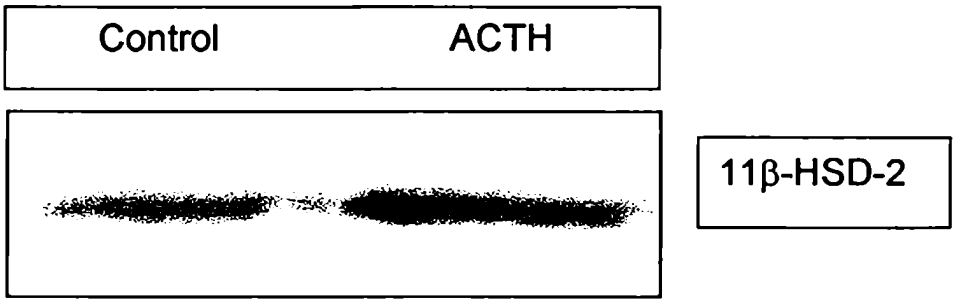


Fig. 3.3.4. Efecto del tratamiento crónico con ACTH *in vivo* en los niveles proteicos de 11β-HSD-2 adrenal. Se trataron ratas con ACTH (5 UI ACTH/día, *i.m.* y 2 UI ACTH-GEL/día, *i.m.*) durante 48 hs, las glándulas adrenales se extrajeron, homogeneizaron y los niveles proteicos de 11β-HSD-2 se analizaron mediante la técnica de Western-blot.Calle 1: Control, calle 2: ACTH.

Por el momento no fue posible poner a punto las condiciones para la determinación de los niveles intraadrenales de mRNA de 11β–HSD-1 ya que se ensayaron distintas condiciones de hibridización del Northern-blot (42 y 50 C) pero no se observaron bandas en ninguno de los dos casos.

Por otro lado, el anticuerpo anti 11β-HSD-1 de rata no se halla disponible en la actualidad. El único anticuerpo policlonal de este tipo, desarrollado originalmente por Monder C. y Lakshmi V. [208], se ha prácticamente agotado. Se han realizado contactos con los Dres. Z. Krozowsky (Baker Institute, Australia) y C.E. Gomez-Sanchez (University of Missouri-Columbia, USA) para obtener este anticuerpo que se hallan desarrollando actualmente.

Efecto agudo de ACTH en células de fasciculata adrenal *in vitro*

El efecto agudo de ACTH sobre la actividad de 11β–HSD fue también ensayado en un modelo experimental *in vitro* de células aisladas de fasciculata adrenal de rata obtenidas por dispersión enzimática.

Las células aisladas de fasciculata adrenal fueron preincubadas con cianocetona (inhibidor de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ-4-isomerasa) con el fin de inhibir la biosíntesis de corticosterona. Luego, las células pretratadas fueron incubadas con ACTH durante 60 min, posteriormente se homogeneizaron y se determinó la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD en la fracción microsomal.

ACTH inhibió la actividad enzimática de ambas isoformas de la 11β–HSD en células de fasciculata adrenal de rata determinada en la fracción microsomal (Tabla 3.3.2).

Tabla 3.3.2: Efecto de ACTH en la actividad enzimática de 11β-HSD en microsomas de células de fasciculata adrenal.

Isoforma	Actividad 11β-HSD (% control)
11β–HSD-1	68 ± 11 *
11β–HSD-2	53 ± 7 **

*: $p < 0.07$; **: $p < 0.01$; en ambos casos respecto del Control (100 %). Los datos se presentan como medias ± ES (n= 4).

Para evaluar el efecto de cianocetona y ACTH, células de fasciculata adrenal de rata se preincubaron o no con cianocetona, posteriormente se estimularon con ACTH y se determinó los niveles de corticosterona biosintetizada.

En la Tabla 3.3.3 se observa que ACTH produce un notable incremento de más de 80 veces en la producción de corticosterona por células de fasciculata. Sin embargo, este aumento producido por ACTH es totalmente bloqueado por el pretratamiento con cianocetona.

Tabla 3.3.3: Efecto de cianocetona sobre la estimulación de la produccion de corticosterona mediada por ACTH en células de fasciculata adrenal.

Tratamiento	Cianocetona	Corticosterona ($ng/10^5$ células.h)
Control	-	5.0 ± 0.5
ACTH		443 ± 25 *
Control	+	8.0 ± 0.6
ACTH	+	6.0 ± 0.8 **

10^5 Células de fasciculata adrenal se incubaron en presencia o ausencia de cianocetona (10 μM) durante 30 min y luego se estimularon con ACTH (10 nM) durante 60 min. La corticosterona producida se determinó por RIA. Los datos se presentan como media ± ES (n= 4). *: $p < 0.02$, respecto del Control sin cianocetona, **: $p > 0.7$, NS, respecto del Control con cianocetona.

Efecto agudo de ACTH en células de fasciculata adrenal in vitro: *Parámetros cinéticos*

Los parámetros cinéticos para 11β–HSD-2 fueron determinados en microsomas de células pretratadas con cianocetona y estimuladas o no con ACTH (Tabla 3.3.4). El tratamiento con ACTH no modificó el valor de K_m pero redujo la $V_{máx}$ en un 60.1 %.

Efecto de ACTH en células enteras

El efecto de ACTH sobre la actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD también se estudió en células enteras pretratadas con cianocetona, luego estimuladas con ACTH y finalmente incubadas con [^{3}H]-corticosterona para determinar la actividad de 11β–HSD en las mismas células enteras. En la Fig. 3.3.5 se observa el porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona en función de los minutos de incubación con el sustrato radioactivo en células estimuladas o no con ACTH (10 nM) durante 60 min.

Tabla 3.3.4: Efecto de ACTH en los parámetros cinéticos de 11β-HSD-2 en microsomas de células de fasciculata adrenal.

Tratamiento	K_m (nM)	$V_{máx}$ (pmol/min/mg prot)
Control	24.6 ± 3.7	4.34 ± 1.35
ACTH	21.9 ± 4.8	1.73 ± 0.43 *

Células dispersas de fasciculata adrenal de rata fueron incubadas con 10 μM cianocetona durante 30 min y luego estimuladas con 10 nM ACTH durante 60 min. Las células se homogeneizaron y se obtuvo la fracción microsomal dónde se determinaron los valores de K_m y $V_{máx}$ como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los valores se presentan como medias ± ES (n= 4). *: p< 0.05respecto del Control.

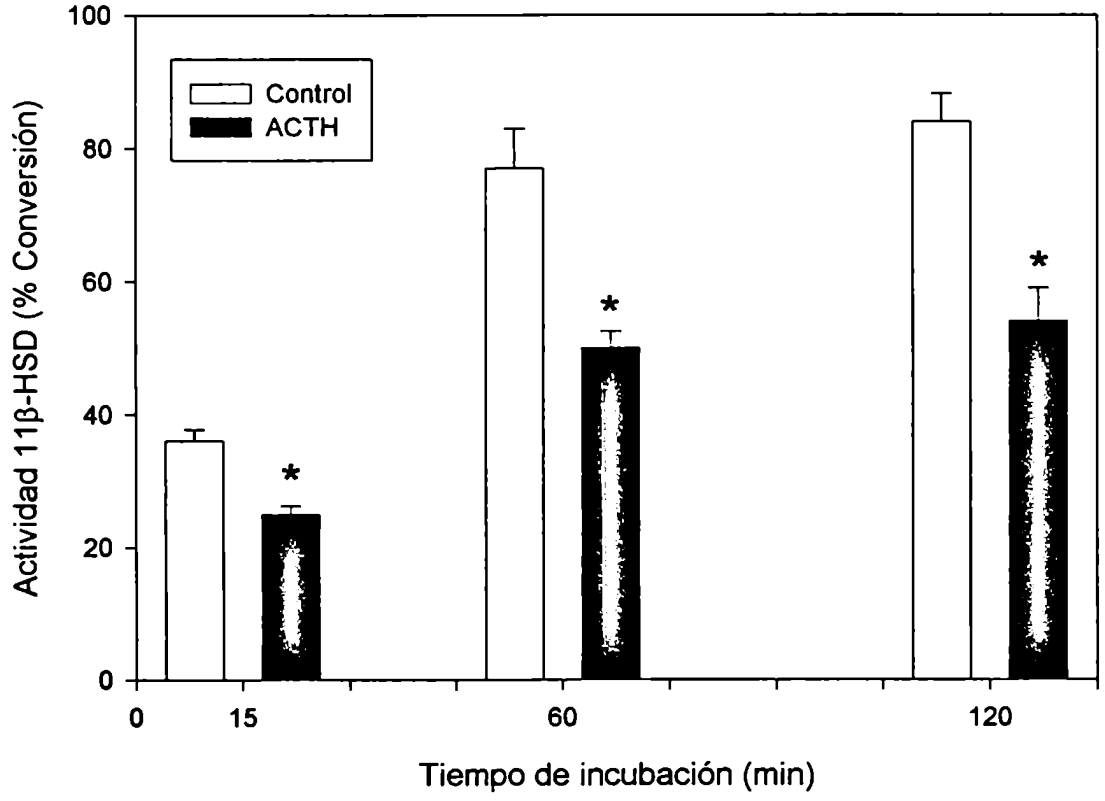


Fig. 3.3.5. Efecto de ACTH sobre la actividad de 11β-HSD determinada en células enteras. 10^4 Células pretratadas con cianocetona 10 μM fueron estimuladas con ACTH 10 nM durante 60 min y luego incubadas por tiempos variables con [^{3}H]-corticosterona para determinar la actividad de 11β-HSD. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: p < 0.05, ACTH respecto del Control.

La conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona es dependiente del tiempo de incubación con el sustrato y en todos los casos se observa una disminución de la conversión causada por ACTH.

Es importante destacar que las células son preincubadas con cianocetona 10 μM durante 30 min antes de la estimulación con ACTH y que ésta permanece presente en la incubación de las células tanto con ACTH como con el sustrato radiactivo.

Justificación del uso de cianocetona: Inhibición de la producción de corticosterona

Debido a que en este modelo experimental es de suma importancia reducir al mínimo la diferencia en concentraciones intracelulares de corticosterona entre los distintos tratamientos se realizaron ensayos con el fin de determinar qué compuestos inhibidores de la esteroidogénesis podían ser utilizados para ese fin. Para ello, células de fasciculata adrenal fueron preincubadas con distintos compuestos durante 30 min, luego estimuladas o no con ACTH 10 nM durante 60 min y posteriormente se determinaron los niveles de corticosterona biosintetizada. En la Fig. 3.3.6 se observa que ACTH produce un notable incremento en la producción de corticosterona y que ésta no es afectada notoriamente por DMSO 0.1 o 1.0 % final en los ensayos; DMSO fue utilizado como vehículo para los distintos compuestos ensayados. Los porcentajes de inhibición de la producción de corticosterona para los distintos compuestos descriptos a continuación fueron calculados respecto de los valores obtenidos para las células tratadas con ACTH y concentraciones semejantes de DMSO. Tanto aminoglutetimida como aminoglutetimida-fosfato inhibieron parcialmente la corticosteroidogénesis estimulada por ACTH: a concentraciones 10 μM inhibieron un 22-27 % mientras que a concentraciones de 100 μM inhibieron entre un 63-78 %. Sin embargo, a la mayor concentración ensayada aún existe una importante diferencia en la corticoesteroidogénesis entre las células estimuladas con ACTH y las controles. Metirapona, por otra parte, inhibió la estimulación por ACTH sólo en un 17 % a concentraciones finales de 25 μM.

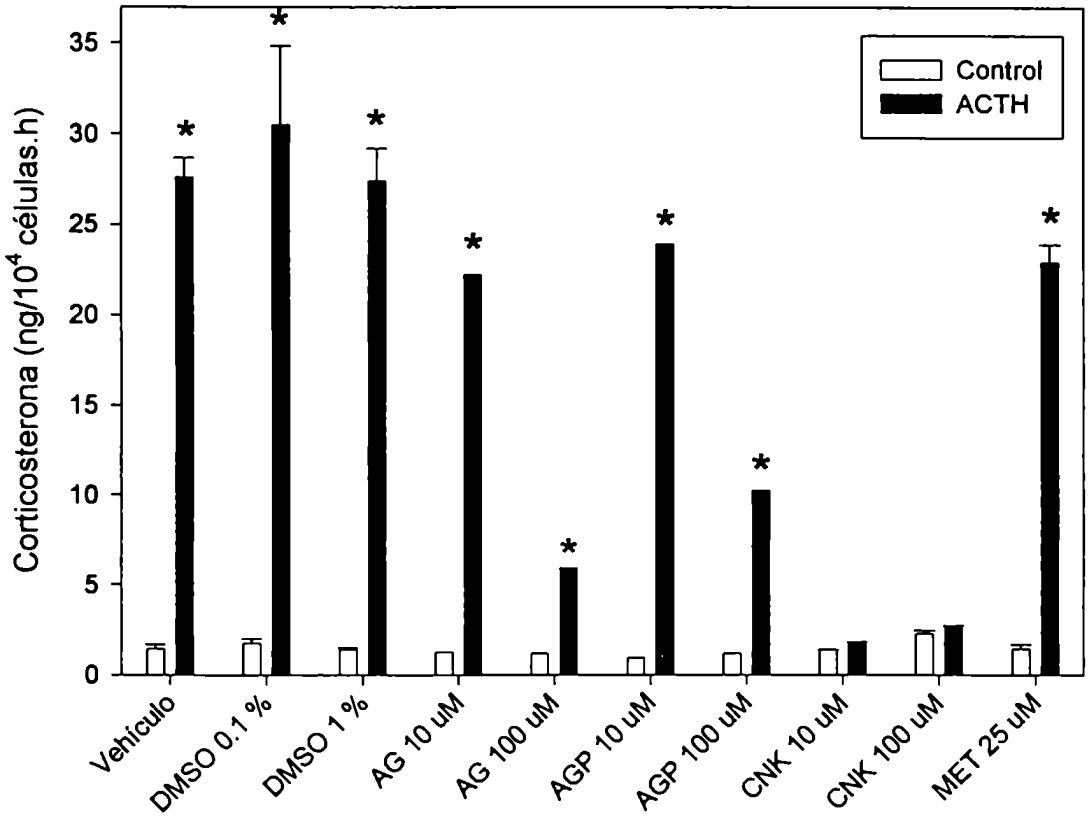


Fig. 3.3.6. Efecto de diversos compuestos sobre la corticoesteroidogénesis adrenal inducida por ACTH. 10^4 Células fueron pretratadas con los distintos compuestos durante 30 min y luego estimuladas con ACTH 10 nM durante 60 min. La corticosterona producida fue determinada por RIA en los sobrendantes de incubación. AG: aminoglutetimida, AGP: aminoglutetimida-fosfato, CNK: cianocetona, MET: metirapona. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.01$ ACTH respecto del Control para cada tratamiento.

Cianocetona inhibió un 94 y 90 % la corticoesteroidogénesis mediada por ACTH a concentraciones de 10 y 100 µM respectivamente.

Es muy importante destacar que cianocetona bloquea completamente la estimulación por ACTH 10 nM, no observándose diferencias significativas entre las células control y las estimuladas con ACTH para ambas concentraciones de cianocetona utilizadas. De estos resultados se desprende que se podría utilizar cianocetona en concentraciones de 10 ó 100 µM para bloquear la corticoesteroidogénesis adrenal con el fin de disminuir al mínimo las diferencias en los niveles de corticosterona entre los distintos tratamientos y así evitar artefactos de dilución isotópica. Del mismo modo, en los tratamientos *in vivo*

la dilución isotópica se eliminó por el lavado de los microsomas (ver *Efecto agudo de ACTH* in vivo).

Justificación del uso de cianocetona 10 μM: Inhibición de la actividad de 11β-HSD

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para ensayar la actividad de 11β–HSD en células enteras se realizaron determinaciones de dicha actividad enzimática en células controles y estimuladas con ACTH 10 nM en presencia de distintas concentraciones de

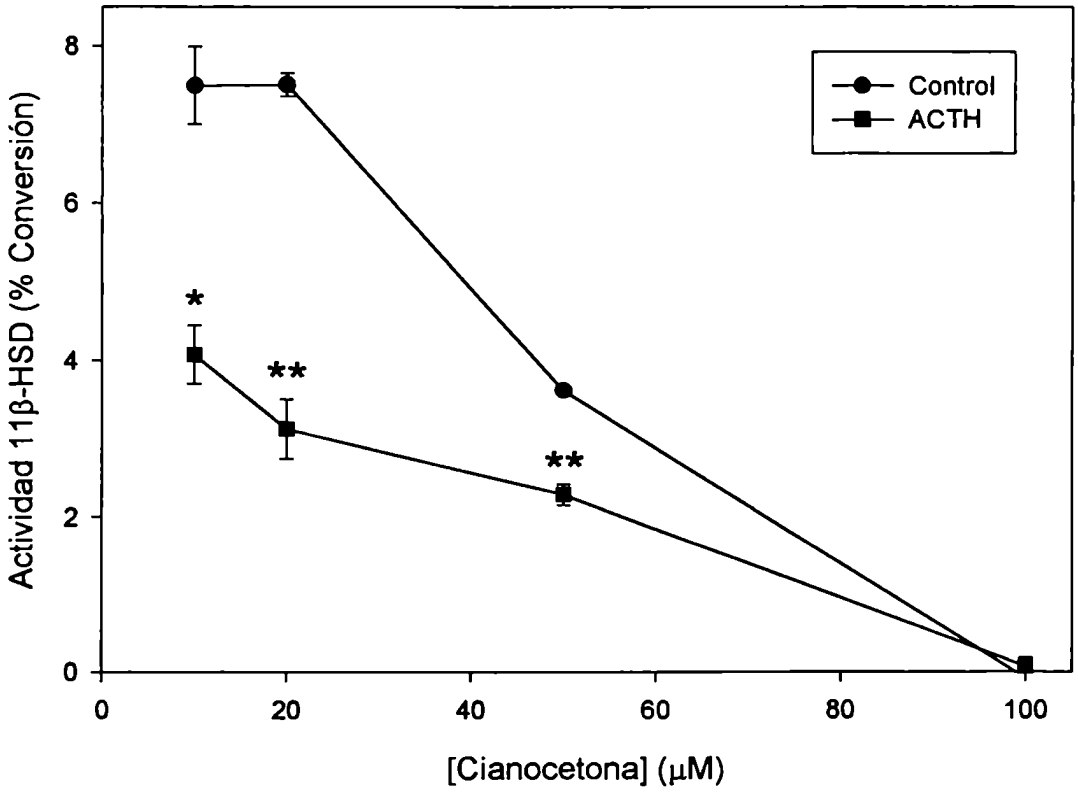


Fig. 3.3.7. Efecto de cianocetona sobre la actividad de 11β-HSD en células enteras. 10^4 Células de fasciculata se preincubaron con distintas concentraciones de cianocetona durante 30 min, luego se estimularon con ACTH 10 nM durante 60 min y finalmente se determinó la actividad de 11β-HSD que se expresa como el porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, en ambos casos ACTH respecto del Control para cada concentración de cianocetona.

cianocetona, la cuál se halló presente en la preincubación, estimulación y ensayo de actividad. El fin de estos experimentos fue encontrar una concentración de cianocetona que, inhibiendo la producción de corticosterona, no afectase la actividad de 11β-HSD.

En la Fig. 3.3.7 se observan los resultados de la determinación de la actividad de 11β–HSD en células enteras con concentraciones crecientes de cianocetona entre 10 y 100 μM. En las células control se observa que cianocetona reduce la actividad de 11β–HSD a concentraciones mayores a 20 μM indicando que posee un efecto inhibitorio sobre la actividad de 11β–HSD. ACTH produce el efecto inhibitorio en la actividad de 11β–HSD observado anteriormente a concentraciones de cianocetona entre 10 y 50 μM de cianocetona. Concentraciones de 100 μM de cianocetona inhiben la actividad de 11β–HSD a niveles indetectables.

En la Tabla 3.3.5 se observan las relaciones tratado/control para la actividad de 11β–HSD de los datos de la Fig. 3.3.7. Se observa que la disminución de la actividad de 11β–HSD provocada por ACTH se mantiene relativamente constante a concentraciones

Tabla 3.3.5: Efecto de cianocetona en la actividad de 11β–HSD y en la producción de corticosterona en células enteras de fasciculata adrenal

[Cianocetona] (μM)	Actividad 11β–HSD (% +ACTH/-ACTH)	Corticosterona (+ACTH/-ACTH)
0	ND	52.68
10	59.3	1.28
20	36.5	1.12
50	59.5	1.07
100		0.98

10^4 Células de fasciculata adrenal fueron preincubadas con concentraciones crecientes de cianocetona, luego tratadas con 10 nM ACTH durante 60 min y finalmente incubadas con [^{3}H]-corticosterona durante 15 min. Por último, se determinó la actividad de 11β–HSD como se detalla en *Materiales y Métodos* y la producción de corticosterona por RIA. ND: No determinado.

de cianocetona entre 10 y 50 μM indicando que la reducción de la actividad de 11β–HSD provocada por cianocetona (Fig. 3.3.7) afecta en forma proporcional a la actividad enzimática de las células controles y tratadas con ACTH. Cianocetona inhibió la corticosteroidogénesis en forma dosis dependiente no observándose diferencias significativas entre los controles y los tratados a concentraciones mayores a 20 μM.

En base a estos resultados se fijaron las condiciones óptimas para la determinación de la actividad de 11β–HSD en células enteras utilizando 10^4 células de fasciculata preincubadas durante 30 min con cianocetona 10 μM. A esta concentración, cianocetona inhibe la estimulación de la corticosteroidogénesis causada por ACTH sin afectar sustancialmente la actividad enzimática de 11β–HSD.

Direccionalidad de la reacción de 11β–HSD

Posteriormente se estudió la dirección de la reacción de la actividad de 11β–HSD en células enteras. Para ello, células pretratadas con cianocetona 10 μM se estimularon con ACTH 10 nM y luego se incubaron con [^{3}H]-corticosterona o [^{3}H]-11-dehidrocorticosterona como sustratos para determinar las actividades de deshidrogenasa y reductasa en células enteras. Las células controles presentaron un porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona de 17.06 % y las tratadas con ACTH de 9.78 % luego de 15 min de incubación con [^{3}H]-corticosterona. Sin embargo, las células estimuladas o no con ACTH no mostraron conversión detectable de [^{3}H]-11-dehidrocorticosterona a corticosterona con respecto a los controles sin células en idénticas condiciones experimentales. Estos resultados indicarían que en células aisladas de fasciculata adrenal de rata la principal actividad de 11β–HSD es de deshidrogenasa.

Curva dosis-respuesta de ACTH

Se realizaron curvas dosis-respuesta para estudiar el efecto de concentraciones crecientes de ACTH sobre la actividad de 11β–HSD y la producción de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona en células enteras de fasciculata adrenal. En la Fig. 3.3.8-A se

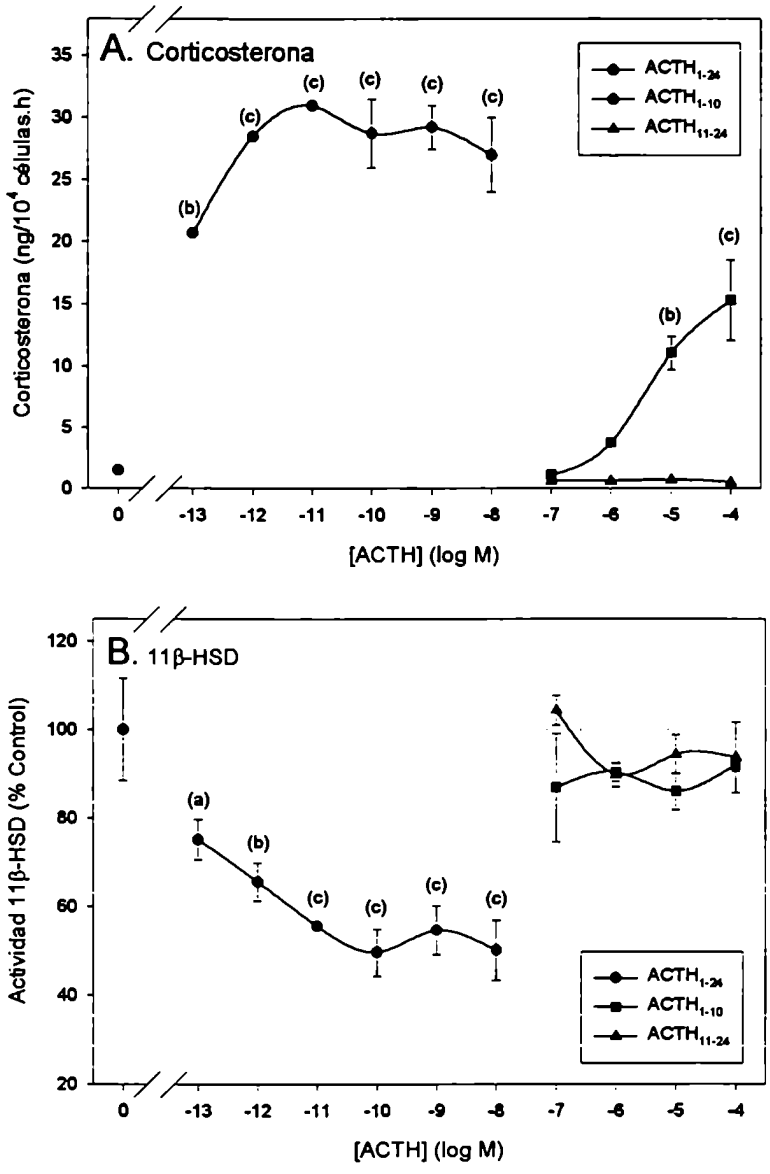


Fig. 3.3.8. Efecto de $ACTH_{1-24}$, $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$ en la producción de corticosterona y la actividad de 11β-HSD en células enteras. 10^4 Células se incubaron con concentraciones crecientes de los péptidos de ACTH durante 60 min y luego los niveles de corticosterona se determinaron por RIA en los sobrenadantes de incubación (panel A). En paralelo, células preincubadas con cianocetona 10 μM durante 30 min fueron estimuladas con los péptidos de ACTH en forma similar y posteriormente se determinó la actividad de 11β-HSD en células enteras. (a): $p < 0.05$; (b): $p < 0.005$; (c): $p < 0.001$, respecto del control sin ACTH.

observa que concentraciones crecientes de ACTH producen un incremento dosis dependiente en la producción de corticosterona biosintetizada por células de fasciculata luego de 60 min de tratamiento con la hormona, alcanzando un máximo a concentraciones de 10 pM de $ACTH_{1-24}$. La producción de 11-dehidrocorticosterona no

fue alterada por $ACTH_{1-24}$ en todo el rango estudiado, observándose valores de biosíntesis de 0.5-4 ng/10^4 células.h.

La actividad de 11β–HSD determinada en células enteras disminuye en forma dosis dependiente con concentraciones crecientes de $ACTH_{1-24}$ alcanzando un máximo de inhibición a concentraciones de 100 pM de $ACTH_{1-24}$ (Fig. 3.3.8-B).

Efecto de los fragmentos de $ACTH_{1-24}$: $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$

Li Z.G. et al. [516] postularon que los fragmentos $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$ pueden simular, por separado, algunos de los efectos de $ACTH_{1-24}$, pudiéndose así utilizar como herramientas para la determinación de la subpoblaciones de receptores de ACTH involucradas. Se ensayó el efecto de los fragmentos de $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$ en la producción de corticosterona (Fig. 3.3.8-A) y en la actividad de 11β–HSD en células enteras (Fig. 3.3.8-B). $ACTH_{1-10}$ produjo un incremento de la corticosteroidogénesis adrenal en forma dosis-dependiente alcanzando valores máximos de estimulación a concentraciones de 100 μM, correspondientes a un 56 % de la producción de corticosterona alcanzada con $ACTH_{1-24}$. $ACTH_{1-24}$ no modificó la producción basal de corticosterona. $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$ no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de 11β–HSD determinada en células enteras, aún a concentraciones de 100 μM (Fig. 3.3.8-B). Cuando se realizaron incubaciones con ambos fragmentos a una concentración final de 100 μM cada uno, se obtuvieron valores de producción de corticosterona similares a los obtenidos con el fragmento $ACTH_{1-10}$ y tampoco se observó ningún efecto sobre la actividad de 11β–HSD (datos no mostrados).

Efecto de inhibidores de la 11β-HSD en células de fasciculata

Se realizaron ensayos con inhibidores de la 11β–HSD para estudiar el efecto de su inhibición en la esteroidogénesis adrenal basal. Para ello, células de fasciculata adrenal de rata se incubaron con concentraciones crecientes de los inhibidores de la 11β–HSD como 11αOH-progesterona y ácido glicirretínico. Posteriormente se determinó el efecto de estos compuestos en la actividad enzimática de 11β–HSD en células enteras y en la

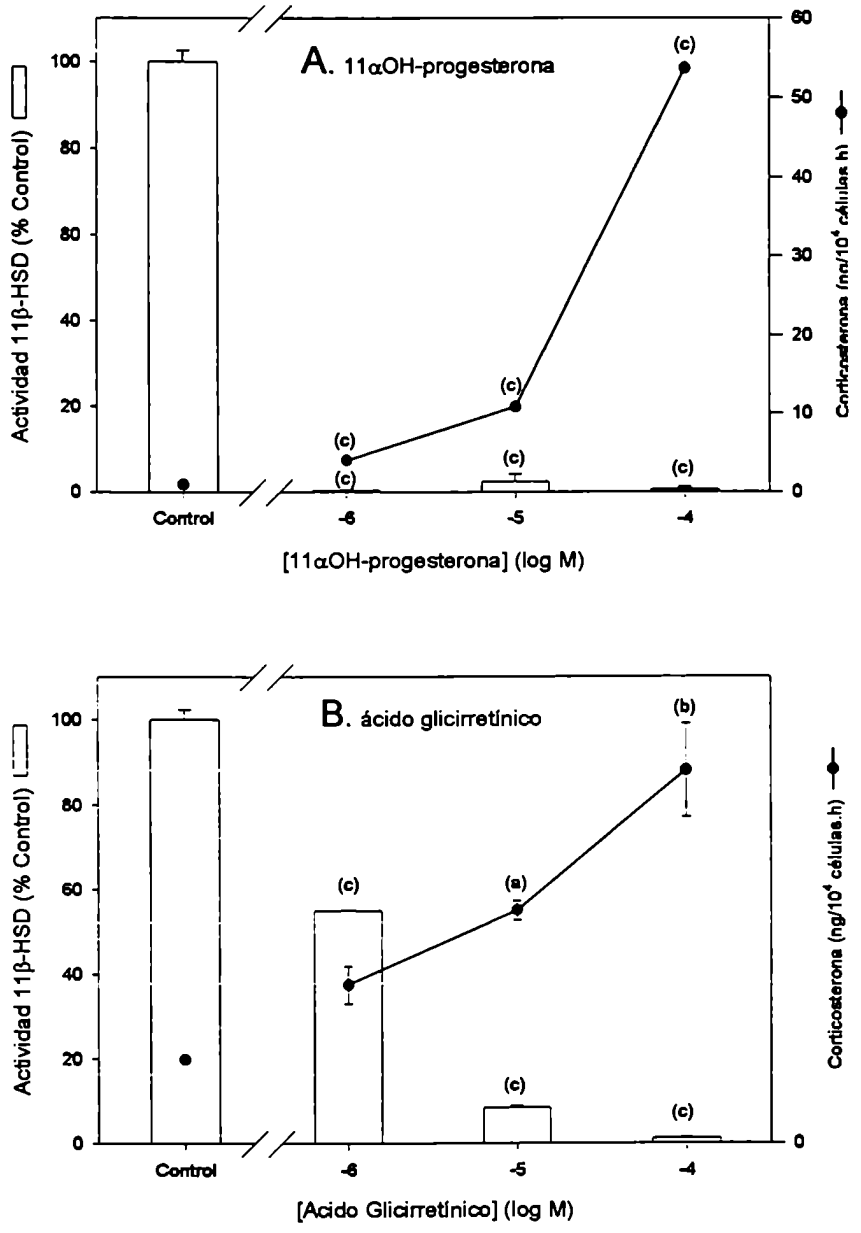


Fig. 3.3.9. Efecto de inhibidores de 11β-HSD en la producción basal de corticosterona por células de fasciculata. Para la determinación de la producción de corticosterona, 10^4 células de fasciculata se incubaron con concentraciones crecientes (10^{-6} - 10^{-4} M) de los compuestos ensayados durante 60 min a 37 C y luego se determinaron los niveles producidos del esteroide por RIA en los sobrenadantes. Para la determinación de la actividad de 11HSD, 10^4 células de fasciculata se incubaron con concentraciones crecientes (10^{-6} - 10^{-4} M) de los compuestos ensayados y 10 μM cianocetona durante 30 min a 37 C y luego se determinó la actividad de 11HSD en células enteras como se detalla en *Materiales y Métodos*. (a): $p < 0.05$; (b): $p < 0.005$; (c): $p < 0.001$, respecto del control sin agregado de inhibidor.

producción de corticosterona. 11αOH-progesterona inhibió casi totalmente (98-100 %) la actividad de 11β–HSD en el rango de concentraciones ensayado (10^{-6} a 10^{-4} M) mientras que el ácido glicirretínico inhibió a la 11β–HSD en forma dosis dependiente alcanzando un 99 % de inhibición con respecto al control a concentraciones de 10^{-4} M (Fig. 3.3.9). La 11αOH-progesterona produjo un incremento en la producción de corticosterona dosis-dependiente alcanzando valores de 53.7 ± 0.1 ng/10^4 células.h a concentraciones de 10^{-4} M. El ácido glicirretínico también causó un aumento de la producción de corticosterona mucho menos notorio pero igualmente significativo alcanzando valores de 1.7 ± 0.2 ng/10^4 células.h a la máxima concentraciones ensayada correspodiendo a 1.9 veces la producción por las células sin compuestos adicionados. Las células controles mostraron una producción de corticosterona de 0.9 ± 0.1 2 ng/10^4 células.h. Como control positivo se estimularon células con 10 nM de $ACTH_{1-24}$ las cuales mostraron una producción de corticosterona de 44.8 ± 1.4 ng/10^4 células.h y una actividad de 11β–HSD de 57.08 ± 0.03 % con respecto al control.

Discusión

ACTH *in vivo* mostró un efecto opuesto en la actividad de 11β–HSD adrenal de rata en tratamientos agudos (30 min) y crónicos (48 hs). Mientras a tiempos cortos se produce una disminución del 70 % en la actividad de deshidrogenasa de ambas isoformas de 11β–HSD, en tratamientos prolongados se produce un incremento de 3.5 veces en la actividad de 11β–HSD-2 (Fig. 3.3.1 y Tabla 3.3.1).

Un posible modelo del rol de la 11β–HSD en la corticosteroidogénesis adrenal se presenta en la Fig. 3.3.10. La zona fasciculata de la glándula adrenal podría hallarse en dos estadios: Basal y Estimulado. En el estadio Basal hay una producción mínima de corticosterona biosintetizada por las enzimas esteroidogénicas no estimuladas. La corticosterona producida podría difundir al medio extracelular o ser metabolizada por la 11β–HSD produciendo 11-dehidrocorticosterona. En el estadio Basal la actividad deshidrogenasa de la 11β–HSD es elevada en la adrenal lo que tiene como consecuencia la inactivación de gran parte de la corticosterona producida haciendo que los niveles secretados de este glucocorticoide sean menores que los producidos. Esto quedaría

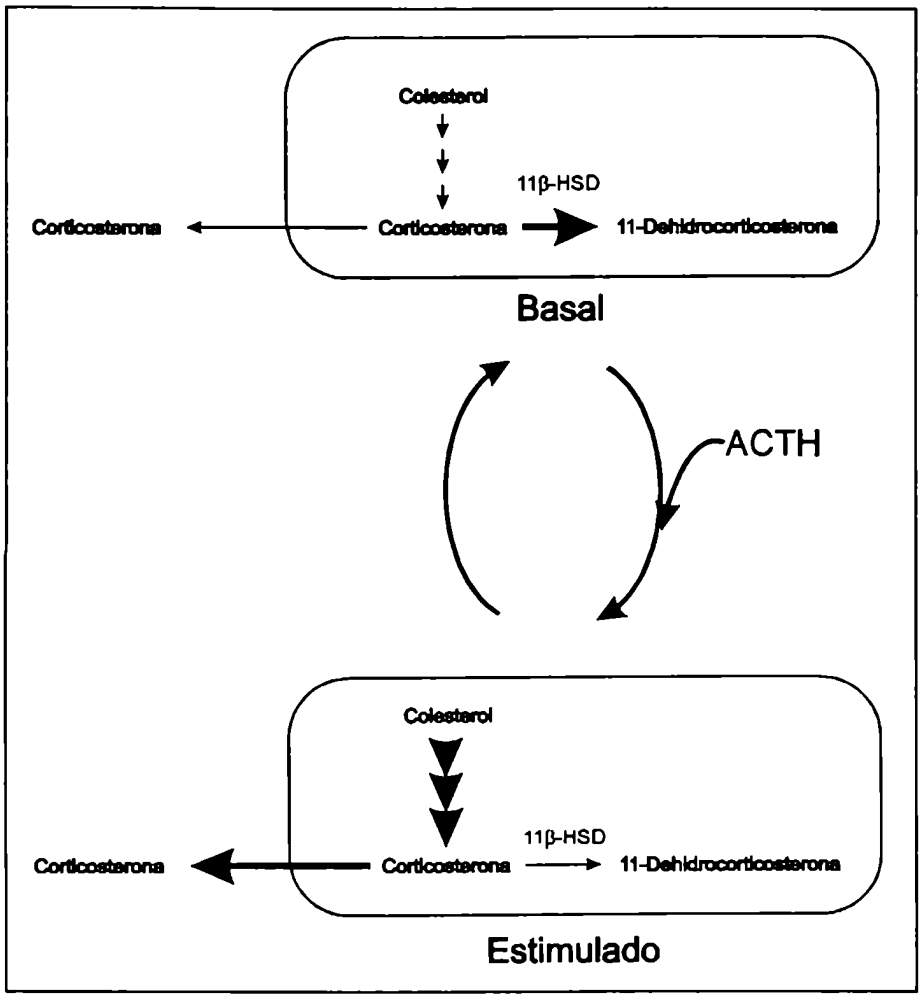


Fig. 3.3.10. Modelo propuesto de la regulación por 11β-HSD de la esteroidogénesis inducida por ACTH en células de fasciculata adrenal.

demostrado con los resultados observados en la Fig. 3.3.9-B donde se observa que el tratamiento de células no estimuladas con ácido glicirretínico produce un aumento de casi el 100 % en la secreción de corticosterona indicando que el 50 % de este esteroide sintetizado es convertido en 11-dehidrocorticosterona por la 11β–HSD adrenal. El tratamiento con ACTH lleva a la zona fasciculata adrenal al estadio Estimulado donde se activa la corticosteroidogénesis incluyendo a los mecanismos de transporte de colesterol y las enzimas de esta vía metabólica. Esto conduce a un aumento de la producción de corticosterona y de la secreción de este esteroide que a su vez se ve incrementado por una disminución de su metabolización por la 11β–HSD. En este caso la inhibición de la 11β–HSD llevaría a una potenciación del efecto estimulatorio de ACTH sobre la metabolización del colesterol reduciendo la inactivación del producto formado.

Luego de producida la respuesta a ACTH se produciría un incremento de la actividad de 11β–HSD lo que causaría una mayor inactivación de la corticosterona producida disminuyendo los niveles efectivos secretados de este esteroide Este hecho, entre otros factores, retornaría a la zona fasciculata al estadio Basal. Así el aumento de la actividad de la 11β-HSD podría actuar como un mecanismo de corte de la acción esteroidogénica inicial de ACTH.

Cuando se estudiaron los tratamientos agudos y crónico con ACTH *in vivo* se requirió, como así tambien en los tratamientos *in vitro*, de un control interno del efecto hormonal. En los estudios *in vitro* se determinaron los niveles de corticosterona biosintetizada. En los estudios con ACTH agudo *in vivo* se determinaron los niveles intraadrenales de corticosterona que como se demostró anteriormente (Fig. 3.3.2) son equivalente a la determinación de las concentraciones esteroideas en plasma para la evaluación del efecto de ACTH. En los estudios agudos *in vivo* se observó un notable incremento en la concentración intraadrenal de corticosterona; sin embargo en tratamientos crónicos de 48 hs no se evidenció tal aumento indicando que probablemente se halla retornado a los niveles basales. En este último caso, el efecto crónico de ACTH se evidenció a través de dos parámetros como ser el peso de la glándula adrenal y del timo. ACTH ejerce un efecto hipertrófico sobre la glándula adrenal que se evidencia a partir de las 48 hs de tratamiento [4,463]. En este caso ACTH produjo un incremento del 13 % en el peso de la glándula adrenal. Por otro lado, ACTH aumenta los niveles plasmáticos de glucocorticoides los cuales producen un efecto timolítico ejercido a través de la inducción de mecanismos de apoptosis en los timocitos [512-514]. El tratamiento crónico con ACTH produjo una reducción del 22 % en el peso del timo. El incremento del peso de la glándula adrenal indicaría un efecto directo de ACTH a la vez que la reducción del peso del timo estaría evidenciando un aumento de los niveles de glucocorticoides mediado por ACTH. Estos datos permiten concluir que ACTH ejerció su efecto crónico en los animales tratados.

El incremento de la actividad de 11β–HSD por el tratamiento crónico con ACTH podría deberse, al menos en parte, a un aumento en los niveles proteicos de 11β–HSD-2 como se evidencia en la Fig. 3.3.4 aunque ACTH no modificó los niveles de mRNA de esta enzima (Fig. 3.3.3). Esta discrepancia entre los niveles de mRNA y proteínas también

fue observada por otros autores. Lehoux J.G. *et al.* [49] estudiaron los niveles de mRNA y proteínas de distintas enzimas esteroidogénicas en adrenales de ratas tratadas cronicamentes con ACTH durante 9 días observando que en la zona glomerulosa no se modifican los niveles de mRNA del citocromo P-450_{scc} mientras que sus niveles proteicos sufren un incremento del 50 % o más llamativamente en la zona fasciculata los niveles de mRNA de la misma enzima se inrementan en un 260 % mientras que los niveles proteicos se reducen al 56 % respecto de los controles sin tratar. Discrepancias similares fueron observadas con el citocromo P-450_{C21} y la 3β-HSD. En cultivos de células adrenales bovinas también se observaron falta de correlación entre los niveles de mRNA y proteínas del citocromo P-450_{C21} bajo estimulación con ACTH [515].

La regulación crónica del camino esteroidogénico por ACTH y otras hormonas, en general, ocurre a nivel de regulación de los niveles de mRNA y proteínas de las enzimas involucradas [1,50,51].

El incremento de actividad de 11β–HSD-2 en el tratamiento crónico con ACTH es acompañado por un incremento en los niveles proteicos. Sin embargo, el incremento en la concentración de proteína evidenciado por Western-blot es menor al que ocurre en la actividad enzimática, lo que podría indicar la existencia de otros mecanismos responsables de este incremento en la actividad. Los niveles de mRNA de 11β–HSD-2 no se modifican por lo que el incremento en los niveles proteicos podría deberse a un aumento en la traducción del mRNA o a una mayor vida media de las moléculas proteicas de 11β–HSD-2 por disminución de su degradación, entre otras posibilidades.

El efecto agudo observado *in vivo* con ACTH sobre la 11β–HSD adrenal sería por un mecanismo directo sobre la zona fasciculata adrenal ya que se observó un efecto inhibitorio similar sobre la actividad de 11β–HSD al trabajar con células aisladas de fasciculata adrenal (Tabla 3.3.2 y Fig. 3.3.5). ACTH inhibió la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD determinada en la fracción microsomal de células de fasciculata. La disminución de la actividad de 11β–HSD-2 involucró una disminución en la $V_{máx}$. El descenso observado en la $V_{máx}$ por la acción del ACTH podría deberse a: i) disminución de la cantidad de enzima (por disminución de su síntesis o aumento de su degradación) o ii) por modulación negativa de su actividad: por agentes (péptidos, lípidos, etc.) producidos o por los sistemas de señales activados como consecuencia de la

acción de ACTH. La primera posibilidad, si bien no puede ser descartada, resulta menos probable debido a que ACTH se ensayó en este experimento en su acción aguda. Con respecto a la segunda posibilidad, la misma se tomó como hipótesis de trabajo para la dilucidación del mecanismo por el cuál ACTH disminuye la $V_{máx}$ de la 11β–HSD-2, y es abordada y desarrollada en la próxima sección de *Resultados y Discusión*.

En otras palabras, si se acepta que:

$$V_{máx} = k_3 \times (E_T)$$

dónde k_3 es la constante específica de velocidad para la transformación de complejo ES en su producto y ET es la concentración total de enzima según la siguiente ecuación:

$$E + S \longleftrightarrow ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

entonces, la primera hipótesis propone una modificación en E_T y la segunda en k_3.

Dado que los esteroides son liposolubles pueden atravesar la membrana plasmática libremente lo que permite que ciertas actividades enzimáticas que los utilizan como sustratos puedan ser determinadas en células enteras. Si bien la incubación de células de fasciculata adrenal con los sustratos marcados no permite discriminar la isoforma de 11β–HSD involucrada en la actividad enzimática observada, los estudios con células enteras permiten una mejor aproximación al marco fisiológico. ACTH produjo, cuando se determinó la actividad de 11β–HSD en células enteras, una disminución de la actividad de deshidrogenasa de la 11β–HSD similar a la observada cuando se trabajó con microsomas de células tratadas en forma semejante.

Los estudios de las actividades de deshidrogenasa de la 11β–HSD determinadas en células enteras indican que las células de fasciculata se comportan como una deshidrogenasa con una actividad de reductasa indetectable. Dado que la 11β–HSD-1 se comporta *in vivo* como una reductasa y la 11β–HSD-2 como una deshidrogenasa [193,224,227,230,231,234,236,293,503], los resultados obtenidos indican que -tanto en condiciones basales como estimuladas con ACTH- la actividad enzimática preponderante en estas células es la de 11β–HSD-2 que funciona como deshidrogenasa.

ACTH produjo una inhibición dosis dependiente de la actividad de 11β–HSD determinada en células enteras (Fig. 3.3.8). El fragmento de $ACTH_{1\text{-}10}$ produjo una

respuesta esteroidogénica parcial con una potencia mucho menor que el fragmento $ACTH_{1-24}$. Sin embargo, $ACTH_{1-10}$ no modificó la actividad de 11β–HSD indicando nuevamente que el efecto producido por ACTH sobre la 11β–HSD es específico y no la resultante de una dilución isotópica del sustrato.

Li Z.G. *et al.* [516] estudiaron el efecto de los fragmentos $ACTH_{1-10}$ y $ACTH_{11-24}$ reportando relaciones de potencias similares para ambos fragmentos, observando efecto esteroidogénico del fragmento $ACTH_{11-24}$ a diferencia de lo informado en este trabajo, aunque otros autores tampoco han observado estimulación de la esteroidogénesis con este fragmento y es más lo han reportado como inhibitorio de $ACTH_{1-24}$ [517]. El efecto esteroidogénico de $ACTH_{1-24}$ puede ser simulado con forskolina (activador de la adenilato ciclasa) o db-cAMP [516]. Cuando células de fasciculata adrenal bovina son incubadas con $ACTH_{1-24}$ y forskolina se observa la misma producción de cortisol que con $ACTH_{1-24}$ solo. Sin embargo, forskolina estimula la secreción de cortisol cuando se incuba junto con $ACTH_{11-24}$ pero no con $ACTH_{1-10}$ indicando que probablemente $ACTH_{1-10}$ actúa vía adenalito ciclasa-cAMP y no así $ACTH_{11-24}$.

$ACTH_{1-10}$ estimuló la esteroidogénesis en células de fasciculata de rata (Fig. 3.3.8) pero no modificó la actividad de 11β–HSD lo cual estaría indicando que la regulación de su actividad no ocurre vía cAMP. Esto se contrapone con los resultados mostrados en la Sección 4 de *Resultados y Discusión* que indicarían una participación de esta vía de señalización intracelular; sin embargo podría ocurrir que la regulación de la actividad de 11β–HSD requiera de algún otro factor de señalización intracelular posiblemente inducido por el resto de la molécula de ACTH. Más que el resto de la molécula probablemente requiera de $ACTH_{1-24}$ en su conformación nativa ya que su efecto no puede ser simulado con la incubación simultánea con los dos fragmentos ($ACTH_{1-10}$ + $ACTH_{11-24}$).

Williams A.C. *et al.* [518] investigaron los niveles secretados de cortisol y corticosterona por células de fasciculata adrenal bovina en cultivo lo cual es una medida indirecta de la actividad de 11β–HSD. Se informó que estas células secretan más cortisona que cortisol en el estado basal y que la estimulación aguda con ACTH aumenta la secreción de cortisol sin modificar la de cortisona. En forma similar, la estimulación aguda con ACTH de células de fasciculata adrenal de rata produjo un notable incremento en la

producción de corticosterona sin modificar la secreción de 11-dehidrocorticosterona (Fig. 3.3.8). Cuando células de adrenal bovina son estimuladas crónicamente con ACTH (6-24 hs), lavadas y nuevamente estimuladas con ACTH durante 60 min se observa una disminución (30-40 %) en la producción de cortisol comparada con células no pretratadas con ACTH y estimuladas en forma idéntica [518]. Por otro lado, la secreción de cortisona se incrementa progresivamente en respuesta al tratamiento crónico con ACTH, alcanzando a las 24 hs de tratamiento valores de 280 % respecto de las células no preincubadas con ACTH. Las relaciones cortisol/cortisona del tratamiento agudo con ACTH disminuyen de 11.0 ± 0.9 en las células sin preincubación a 1.7 ± 0.1 en las células tratadas durante 24 hs con ACTH. Estos resultados concuerdan con los hallados *in vivo* con ratas tratadas crónicamente con ACTH donde se observó un retorno a los niveles basales de la concentración intraadrenal de corticosterona acompañada de un importante incremento en la actividad de 11β–HSD-2 (Tabla 3.3.1).

Esta serie de resultados obtenidos con ACTH concuerdan con los obtenidos por el grupo de Nussdorfer G.G. [390,519] utilizando otros modelos experimentales. Este grupo observó que adrenales de rata perfundidas *in situ* con ACTH presentan un incremento de 3 veces en la secreción de corticosterona y una disminución del 50 % en la liberación de 11-dehidrocorticosterona. La perfusión con ácido glicirretínico (inhibidor de la 11β–HSD) produce un incremento del 38 % en la producción basal de corticosterona y una drástica disminución en la secreción de 11-dehidrocorticosterona debido a la inhibición de su formación a partir de corticosterona por la 11β–HSD [519]. Resultados similares han sido reportados más recientemente con cortes de adrenal humana [390]. Estos resultados apoyan el modelo propuesto de que la inhibición de la inactivación de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona causa un incremento en la producción basal del glucocorticoide activo y que la perfusión con ACTH inhibe a la 11β–HSD como se demuestra en forma directa en esta sección.

Mazzochi G. *et al.* [390] determinaron la actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD en cortes de adrenal humana y observaron una disminución de esta actividad causada por ACTH. En este modelo experimental, cianocetona (1 μM) aumentó la actividad basal de 11β–HSD y anuló el efecto de ACTH. Estos resultados difieren de los presentados en esta sección y muy probablemente se deba a dilución isotópica de la [^{3}H]-corticosterona

utilizada en el ensayo ya que estos autores sólo observaron el efecto de ACTH en ausencia de cianocetona. A su vez, el aumento en los niveles basales de 11β–HSD que observaron con cianocetona podría deberse a una disminución de los niveles endógenos de corticosterona y por lo tanto a un aumento de la actividad específica efectiva de corticosterona en el ensayo.

El tratamiento de células de fasciculata con 11αOH-progesterona, como con ácido glicirretínico, produjo un incremento dosis-dependiente en los niveles de corticosterona (Fig. 3.3.9). Este incremento fue mucho más notorio con 11αOH-progesterona que con ácido glicirretínico. Sin embargo, mientras el ácido glicirretínico también inhibió la actividad de la 11β-HSD en forma dosis dependiente, la 11αOH-progesterona produjo una inhibición de esta actividad enzimática cercana al 100 % en todo el rango de concentraciones ensayado. Estos resultados tornan difícil explicar el incremento en los niveles de corticosterona observados con 11αOH-progesterona a la mera inhibición de la 11β-HSD. Una probable explicación es que la 11αOH-progesterona esté siendo transformada en 11α,21-dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona por acción del citocromo P-450$_{c21}$. 11α,21-Dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona es un esteroisómero de corticosterona (11β,21-dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona) que sólo difiere de éste último en la posición espacial del hidroxilo en el C-11. 11α,21-Dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona podría estar siendo reconocido por el anticuerpo anti corticosterona utilizado en el RIA para determinar la concentración de este último esteroide. Cabe recalcar que los niveles de corticosterona medidos no se deben a reacción cruzada del anticuerpo contra 11αOH-progesterona ya que se realizaron para cada concentración de éste último metabolito los correspondientes controles (también para aminoglutetimida) pero sin células y sus valores fueron restados a los hallados en las incubaciones celulares.

Por lo tanto, en esta sección se demuestra que ACTH modula la actividad de la 11β-HSD adrenal de rata tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, la regulación de esta actividad enzimática modula los niveles de glucocorticoides basales secretados.

Sección 4: Mecanismo de acción de ACTH agudo sobre 11β–HSD en células de fasciculata.

Las células de fasciculata adrenal responden a ACTH con una rápida producción de glucocorticoides. Esta respuesta requiere de un complejo mecanismo de señalización que lleve al interior celular el informe de la presencia de la hormona trófica en el exterior celular. Para ello, el primer paso consiste en la interacción de la molécula de ACTH, circulante en sangre, con su receptor en la membrana de las células adrenales. Dos subpoblaciones de receptores a ACTH han sido descriptos en células adrenocorticales de rata [45,46]. En respuesta a esta interacción se produce el complejo ACTH-receptor con una proteína G_s (estimulatoria), la cual activa a la enzima adenilil ciclasa incrementándose así los niveles intracelulares de cAMP. Esta elevación de los niveles de cAMP lleva a una estimulación de la proteína kinasa dependiente de cAMP (PKA) [18,520]. Diversos autores [463,521-528] han postulado que la estimulación de la esteroidogénesis adrenal por ACTH involucraría también otras vías de señalización intracelular como por ej. influjo de Ca^{2+}, cGMP, inositol trifosfato, ácido araquidónico y la proteína kinasa C dependiente de Ca^{2+} y diacilglicerol también presente en la glándula adrenal [463,522,523,525,527-534]. De todos modos, la principal vía parece ser la de cAMP-PKA.

La importancia de la vía del cAMP-PKA se comprobó desde diversos abordajes experimentales [51,463 y sus citas]. ACTH produce un incremento dosis-dependiente en los niveles de cAMP, el cual es previo a la secreción de esteroides. Por otro lado, un análogo permeable del cAMP como db-cAMP produce una respuesta esteroidogénica similar a la generada por ACTH, lo mismo que activadores directos de la adenilil ciclasa como por ej. forskolina. Estudios con células tumorales adrenocorticales Y-1 deficientes en las actividades de adenilil ciclasa y PKA proveyeron una fuerte evidencia del rol intermediario de estas dos enzimas y el metabolito que las conecta: el cAMP [535]. Resultados similares fueron obtenidos con sistemas reconstituidos de mitocondrias y citosoles provenientes de estos tipos celulares mutantes [536]. A pesar de estas evidencias cabe recalcar que aunque la vía del cAMP-PKA sea esencial para la respuesta esteroidogénica a ACTH no puede descartarse que otras vías de señalización intracelular

se hallen involucradas y ejerzan un importante rol en la regulación de la esteroidogénesis [18,51,463,522,523,525,527-530,532-534] *per se* y/o modulando la vía del cAMP-PKA.

Una vez determinado el efecto inhibitorio de ACTH sobre la actividad de 11β–HSD en células de fasciculata adrenal de rata, analizado tanto en células enteras tratadas con ACTH como en la fracción microsomal de éstas, el próximo objetivo fue el estudio de los mecanismos de señalización intracelular que llevan a dicho evento. Se realizaron experimentos con inhibidores genéricos y selectivos de proteínas kinasas, estimuladores de éstas, estudios del efecto de la fosforilación-desfosforilación sobre la actividad de 11β–HSD-2 y ensayos de fosforilación *in vitro*.

Efecto de Inibidores de Kinasas

Con el fin de estudiar si la señalización intracelular del efecto observado en los tratamientos con ACTH es mediado por alguna proteína kinasa se realizaron experimentos con diversos inhibidores de proteinas kinasas. Primero se utilizaron inhibidores de amplio espectro como la staurosporina y posteriormente específicos de proteinas kinasas A (PKA) como H-89 y de proteinas kinasas C (PKC) como bisindolilmaleimida I (B-I). El modelo experimental consistió en preincubar células aisladas de fasciculata adrenal, previamente tratadas con cianocetona durante 30 min, con concentraciones crecientes de los inhibidores ensayados durante otros 30 min. Luego las células se estimularon con ACTH 10 nM durante 60 min (tiempo en el cual también se hallaban presentes los inhibidores ensayados) y finalmente se determinó la actividad de 11β–HSD en las células enteras. De esta forma, la actividad de 11β-HSD medida corresponde a la suma de las actividades de todas las isoformas presentes en las células. En paralelo, células no preincubadas con cianocetona fueron tratadas como en el caso anterior con los inhibidores ensayados y ACTH para la determinación de la producción de corticosterona por RIA. Por lo tanto, en los resultados que siguen, cuando se informan datos de esteroides estos provienen de experimentos realizados con células sin cianocetona, mientras que cuando se presentan datos de actividad de 11β-HSD, los mismos corresponden a células tratadas con cianocetona.

Efecto de Staurosporina

En la Fig. 3.4.1 (panel superior) se observa que staurosporina, inhibidor genérico de kinasas (IC_{50} para PKA: 7 nM, PKC: 7 nM, Ca^{2+}/Calmodulina kinasa: 20 nM, PKG: 85 nM, kinasa de la cadena liviana de la miosina: 13 nM [537-540]) ejerció un efecto inhibitorio sobre la producción de corticosterona mediada por ACTH (10 nM) a concentraciones mayores a 0.1 μM, revirtiendo totalmente el efecto estimulatorio de ACTH a concentraciones mayores a 1 μM. También se observa que staurosporina no modificó los valores basales de producción de corticosterona en todo el rango ensayado. Tanto con staurosporina como con todos los compuestos ensayados en esta sección se realizaron controles sin células para determinar si estos compuestos presentaban reacción cruzada con el anticuerpo usado en el RIA de corticosterona. Al analizar la actividad de 11β–HSD se observó que ACTH causó el efecto inhibitorio de dicha actividad enzimática mostrado anteriormente en ausencia de staurosporina. Concentraciones crecientes de staurosporina mayores a 0.1 μM provocaron una reversión dosis dependiente del efecto inhibitorio causado por ACTH sobre 11β–HSD (Fig.3.4.1 panel inferior). Staurosporina (1 μM) revirtió la inhibición de 11β–HSD causada por ACTH a valores de 82 % respecto de la actividad en las células no estimuladas mientras que en los controles, sin el agregado de staurosporina, dichos valores fueron de un 48 %. Staurosporina a concentraciones de 10 μM provocó una fuerte inhibición de la actividad de 11β–HSD tanto en los controles como en las células estimuladas con ACTH indicando un posible efecto tóxico sobre la 11β–HSD (Fig.3.4.1 panel inferior). Estos resultados indicarían que al menos una o más proteínas kinasas se hallan involucradas en la regulación de la actividad de 11β–HSD por tratamientos agudos con ACTH.

Con el fin de dilucidar cuál o cuáles proteínas kinasas se hallan involucradas en este proceso se realizaron experimentos con inhibidores más específicos de distintos tipos de proteínas kinasas.

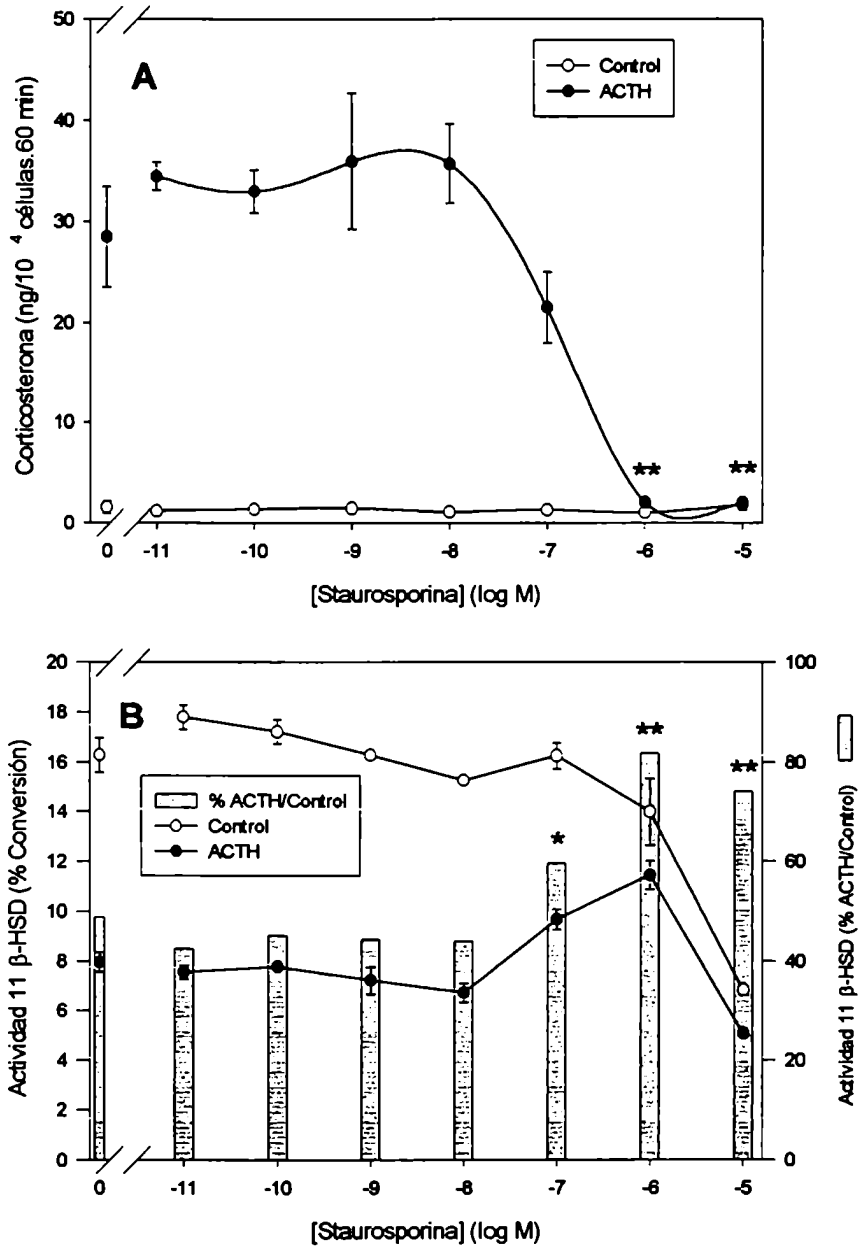


Fig. 3.4.1. Efecto de Staurosporina sobre la corticosteroidogénesis y la actividad de 11β-HSD. 10^4 Células de fasciculata fueron incubadas con concentraciones crecientes de staurosporina y a los 30 min estimuladas con 10 nM ACTH durante otros 60 min. La producción de corticosterona se determinó por RIA (panel A). En forma similar, células pretratadas durante 30 min con cianocetona 10 μM y posteriormente tratadas con staurosporina y ACTH como se describe más arriba se utilizaron para determinar la actividad de 11β-HSD en células enteras la que se expresó como porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona (panel B). En el panel B también se muestran las relaciones Tratado/Control para la actividad de 11β-HSD que se presentan como media sin error standard para claridad del gráfico. En el resto de los casos, los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ respecto del valor sin agregado de staurosporina.

Efecto de H-89

En la Fig. 3.4.2 se observa el efecto de H-89, inhibidor específico de la Proteína Kinasa A (IC_{50} para PKA: 0.048 μM, PKC: 31.7 μM, Ca^{2+}/Calmodulina kinasa: 29.7 μM, Caseína kinasa I: 38.3 μM, Caseína kinasa II: 137 μM, PKG: 0.48 μM, kinasa de la cadena liviana de la miosina: 28.3 μM [541,542]) , sobre la corticosteroidogénesis y la actividad de 11β–HSD. H-89 bloqueó en forma dosis dependiente la corticoesteroidogénesis mediada por ACTH a concentraciones mayores a 10 nM, obteniéndose una inhibición del 100 % a concentraciones de H-89 de 10 μM (Fig. 3.4.2 panel superior). Es de hacer notar que la forma de la curva de inhibición de la corticosteroidogénesis adrenal por H-89 tiene dos fases lo que sugiere la existencia de dos etapas inhibibles por este compuesto, quizás dos proteínas kinasas diferentes. H-89 no modificó la corticoesteroidogénesis basal. La actividad de 11β–HSD de las células no estimuladas con ACTH no se ve afectada por H-89 en todo el rango ensayado pero en las células estimuladas con ACTH se observa una recuperación de la actividad dependiente de la dosis de H-89 (Fig. 3.4.2 panel inferior). Esta reversión de la inhibición de la actividad de 11β–HSD causada por ACTH alcanza valores de 67 % a concentraciones de H-89 de 10 μM. En este caso, el efecto de H-89 sobre la actividad de la 11β-HSD presenta una sóla fase de la curva de inhibición de la producción de corticosterona. Entonces, H-89 inhibiría dos etapas de la corticosteroidogénesis estimulada por ACTH, siendo una sóla de ellas, la segunda, la involucrada en la modulación de la actividad de la 11β-HSD.

Estos resultados indicarían que la inhibición provocada por ACTH en la actividad de 11β–HSD es mediada al menos en parte por una proteina kinasa sensible a H-89 probablemente del tipo PKA.

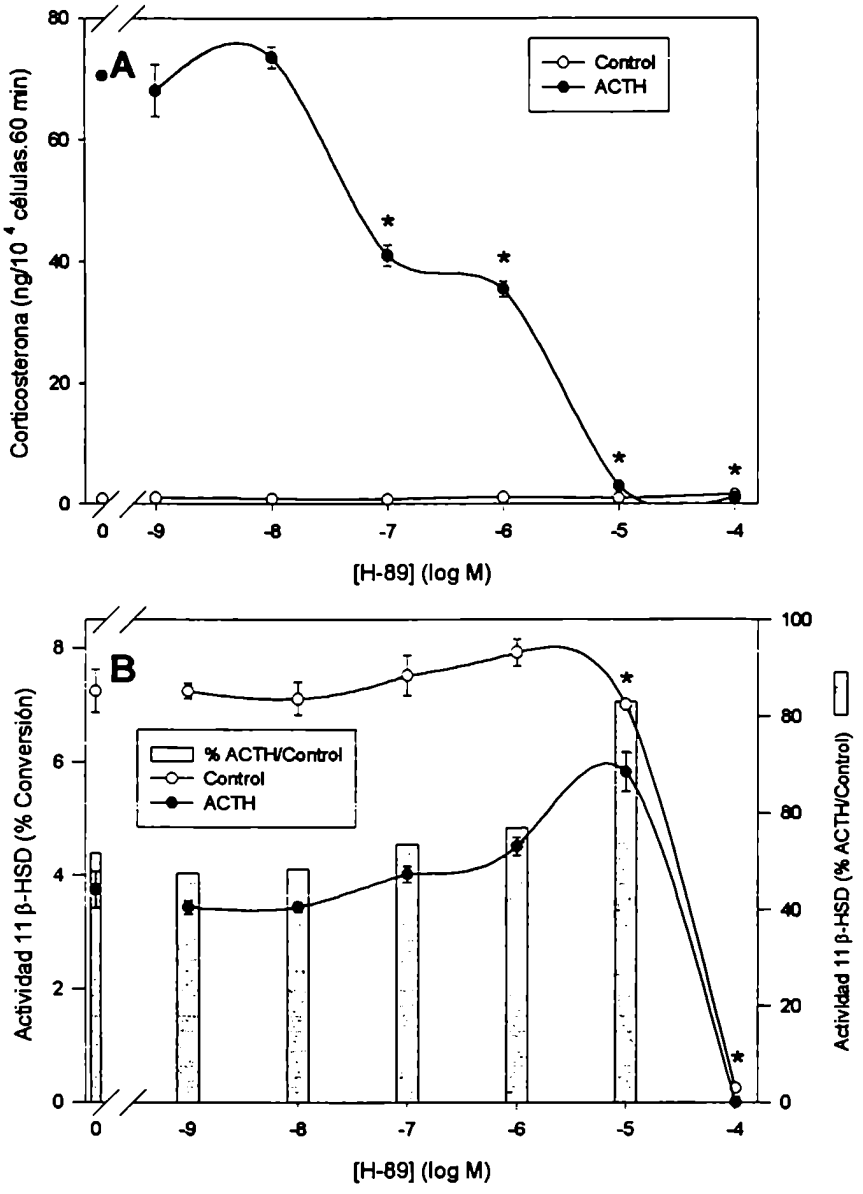


Fig. 3.4.2. Efecto de H-89 sobre la corticosteroidogénesis y la actividad de 11β-HSD. 10^4 Células de fasciculata fueron incubadas con concentraciones crecientes de H-89 y a los 30 min estimuladas con 10 nM ACTH durante otros 60 min. La producción de corticosterona se determinó por RIA (panel A). En forma similar, células pretratadas durante 30 min con cianocetona 10 μM y posteriormente tratadas con H-89 y ACTH como se describe más arriba se utilizaron para determinar la actividad de 11β-HSD en células enteras la que se expresó como porcentaje de conversión de corticósterona en 11-dehidrocorticosterona (panel B). En el panel B también se muestran las relaciones Tratado/Control para la actividad de 11β-HSD que se presentan como media sin error standard para claridad del gráfico. En el resto de los casos, los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.001$ respecto del valor sin agregado de H-89.

Efecto de Bisindolilmaleimida I

Otra proteína kinasa que se supone se halla involucrada en la respuesta de las células de fasciculata a ACTH es la proteína kinasa C. Con ese fin se estudió el efecto de un inhibidor específico de la proteína kinasa C: la Bisindolilmaleimida I (B-I) (IC_{50} para PKA: 2.0 μM, PKC: 0.01 μM [543,544]). En la Fig. 3.4.3 (panel superior) se observa que B-I sólo inhibió significativamente la esteroidogénesis a concentraciones de 10 μM y no presentó efecto alguno sobre la producción de corticosterona basal. B-I no afectó la inhibición de la actividad de 11β–HSD causada por ACTH en todo el rango de concentraciones ensayado y sólo redujo parcialmente la actividad de 11β–HSD de las células no estimuladas con ACTH (Fig. 3.4.3 panel inferior). El cociente de la actividad de las células estimuladas *vs.* las no estimuladas con ACTH mostró un incremento a concentraciones de B-I de 100 μM pero esto no fue debido a una reversión de la inhibición de la actividad de 11β–HSD causada por ACTH. Esto llevaría a concluir que la proteína kinasa C no se halla involucrada en el mecanismo de señalización intracelular que lleva a la inhibición de la actividad de 11β–HSD por ACTH.

Efecto de diversos compuestos sobre la actividad de 11β–HSD microsomal

Como control del efecto específico de los compuestos utilizados se realizaron experimentos con microsomas para descartar cualquier efecto directo sobre la actividad de 11β–HSD que estuviese arrojando resultados no adjudicables a las vías de señalización intracelulares estudiadas. Con ese fin, microsomas de adrenal de rata se incubaron con concentraciones crecientes de los distintos compuestos y [^{3}H]-corticosterona y se determinó la actividad enzimática de 11β–HSD-2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4.1 como porcentajes con respecto al control sin compuestos agregados. ACTH, Staurosporina, B-I y dibutiril cAMP (db-cAMP) no mostraron ningún efecto inhibitorio directo sobre la actividad de 11β–HSD-2 microsomal. Sólo H-89 mostró una inhibición parcial del 77 % a concentraciones de 10^{-4}

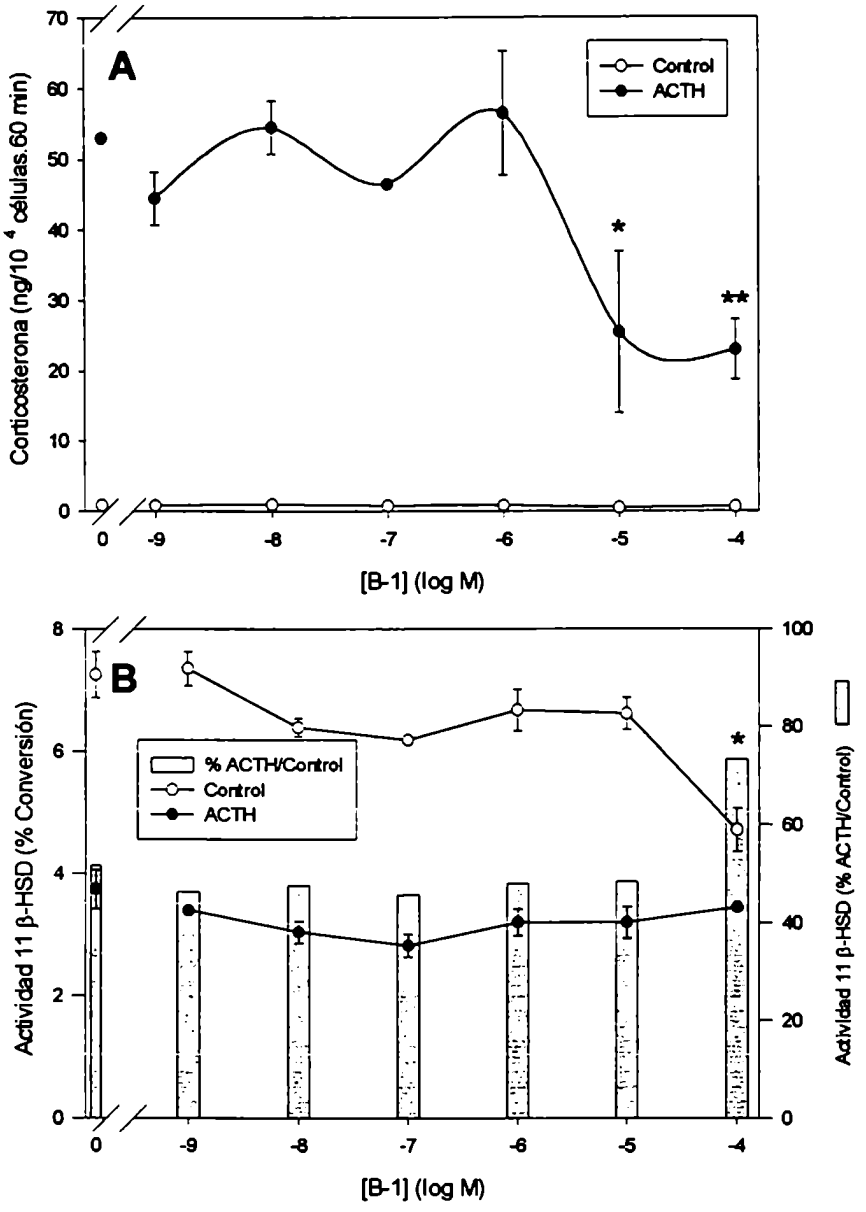


Fig. 3.4.3. Efecto de B-1 sobre la corticosteroidogénesis y en la actividad de 11β-HSD. 10^4 Células de fasciculata fueron incubadas con concentraciones crecientes de B-1 y a los 30 min estimuladas con 10 nM ACTH durante otros 60 min. La producción de corticosterona se determinó por RIA (panel A). En forma similar, células pretratadas durante 30 min con cianocetona 10 μM y posteriormente tratadas con B-1 y ACTH como se describe más arriba se utilizaron para determinar la actividad de 11β-HSD en células enteras la que se expresó como porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona (panel B). En el panel B también se muestran las relaciones Tratado/Control para la actividad de 11β-HSD que se presentan como media sin error standard para claridad del gráfico. En el resto de los casos, los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$ respecto del valor sin agregado de B-1.

M, lo cuál se correlaciona con el hecho de que a esa concentración no se observó actividad de 11β–HSD en células enteras.

Tabla 3.4.1: Efecto de diversos compuestos sobre la actividad de 11β–HSD-2 microsomal

Compuesto	Concentración (log M)	Actividad 11β–HSD-2 (% Control)
ACTH	-10	108.0 ± 5.3
	-9	108.5 ± 22.5
	-8	101.2 ± 11.3
Staurosporina	-8	101.1 ± 3.0
	-7	85.1 ± 11.6
	-6	101.0 ± 5.6
	-5	94.3 ± 6.3
H-89	-7	99.2 ± 25.4
	-6	98.3 ± 30.3
	-5	78.9 ± 18.3
	-4	32.6 ± 2.8 ** ($p < 0.02$)
B-I	-7	98.7 ± 10.1
	-6	93.3 ± 4.2
	-5	87.7 ± 11.9
	-4	82.7 ± 12.7

db-cAMP	-6	98.6 ± 0.9
	-5	100.3 ± 13.7
	-4	99.9 ± 8.0
	-3	86.1 ± 11.4

20 µg de proteína microsomal de adrenal de rata se incubaron con concentraciones crecientes de los compuestos ensayados, 200.000 dpm de [^{3}H]-corticosterona y 0.5 mM NAD^+ durante 15 min y luego se determinó la actividad de 11β–HSD-2 como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos se presentan como Media ± ES (n= 2). ANOVA seguido de contrastes por Tukey.

Efecto de db-cAMP

Dado que por los resultados previos era factible suponer que el efecto de ACTH sobre la actividad de 11β–HSD podía ser mediado por el sistema de señalización intracelular de PKA, Proteína kinasa dependiente de cAMP, se quiso estudiar si se podía simular el efecto de ACTH con el análogo permeable de cAMP, el dibutiril cAMP (db-cAMP). Para ello se incubaron células de fasciculata adrenal de rata con concentraciones crecientes de db-cAMP y se determinó la producción de corticosterona y la actividad de 11β–HSD en células enteras. En la Fig. 3.4.4 se observa que db-cAMP produjo un incremento en la producción de corticosterona dosis-dependiente alcanzando a valores de 1 mM estimulaciones de 30 veces sobre el nivel basal. A concentraciones de máxima estimulación de la esteroidogénesis (1 mM) db-cAMP produjo una inhibición de la actividad de 11β–HSD de un 28 % respecto de los controles. Estos resultados indicarían que la inhibición de la 11β–HSD podría ser mediada, entre otros factores, por un aumento de la actividad de PKA causado por un incremento de los niveles intracelulares de cAMP.

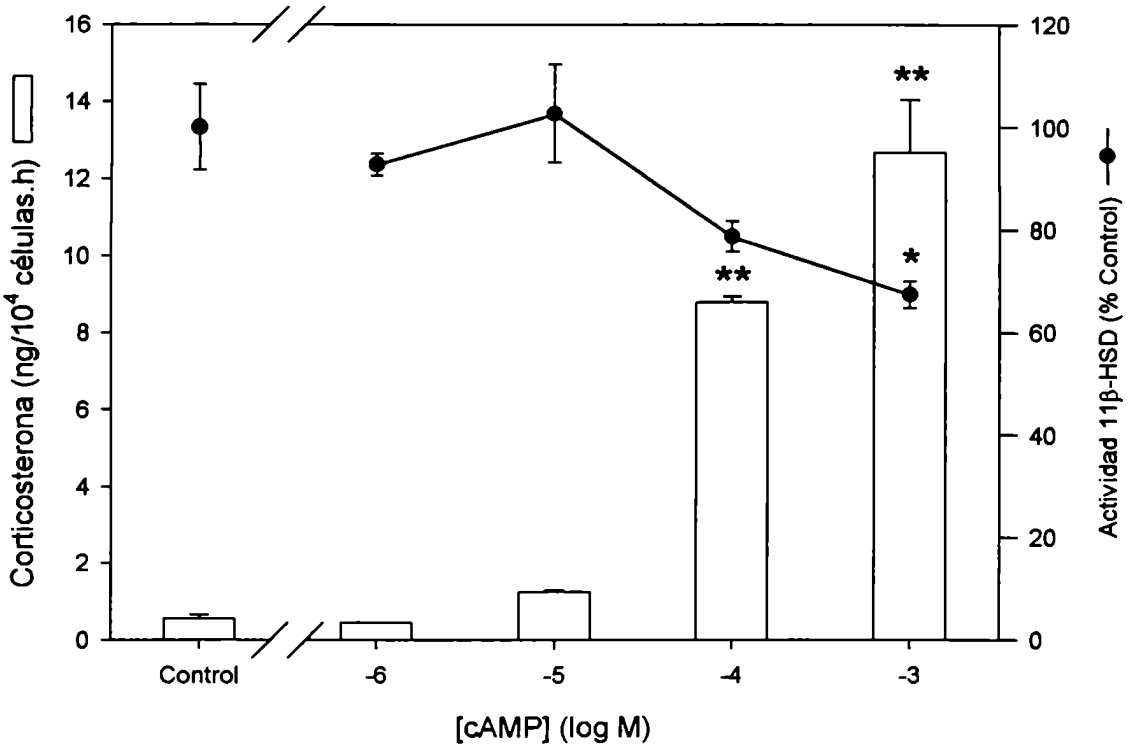


Fig. 3.4.4. Efecto de db-cAMP en la corticoesteroidogénesis y la actividad de 11β-HSD. 10^4 Células de fasciculata fueron incubadas con concentraciones crecientes de db-cAMP durante 60 min. La producción de corticosterona se determinó por RIA (barras). En forma similar, células pretratadas durante 30 min con cianocetona 10 μM y posteriormente incubadas con concentraciones crecientes de db-cAMP durante 60 min se utilizaron para determinar la actividad de 11β-HSD en células enteras que se expresó como porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona (•). Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, respecto del control sin agregado de db-cAMP.

Efecto de fostatasa alcalina sobre la actividad de 11β–HSD-2

Para estudiar si los procesos de fosforilación-desfosforliación están involucrados directa o indirectamente en la regulación de la actividad de 11β–HSD se realizaron estudios de desfosforilación *in vitro* de la fracción microsomal con fosfatasa alcalina y luego se determinó la actividad enzimática de 11β–HSD-2.

Los resultados presentados a continuación se realizaron con microsomas provenientes de animales tratados con ACTH durante 30 min, resultados similares (aunque menos significativos) se obtuvieron con microsomas de animales normales.

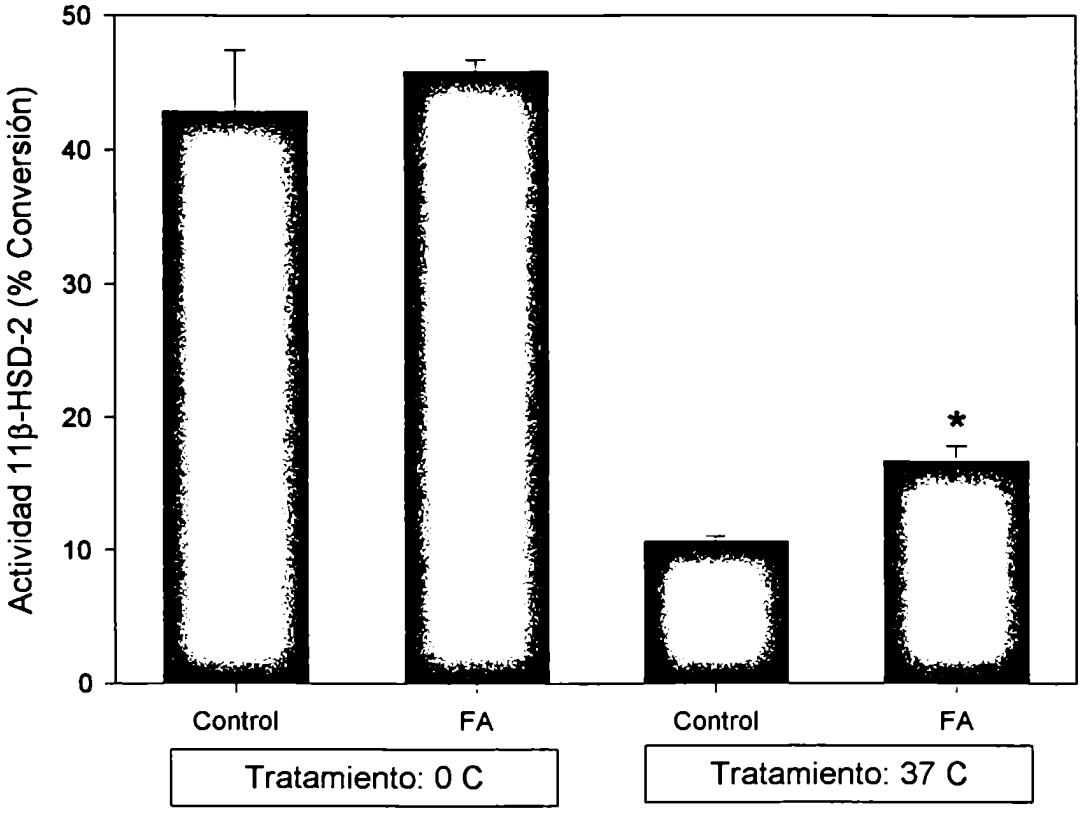


Fig. 3.4.5. Efecto del tratamiento con fosfatasa alcalina sobre la actividad de 11β-HSD-2 microsomal. 20 µg de proteína microsomal de adrenales de ratas inyectadas con ACTH (5 UI) 30 min antes del sacrificio se incubaron con 1.85 UI de fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina durante 15 min a 0 o 37 C. La reacción se detuvo con el agregado de EDTA y luego se adicionó [^{3}H]-corticosterona y NAD^+ para la determinación de la actividad de 11β-HSD-2 como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.001$.

En la Fig. 3.4.5 se observa que la preincubación con fosfatasa alcalina a 0 C de microsomas adrenales provenientes de ratas tratadas con ACTH no produjo ningún efecto en la actividad enzimática de 11β–HSD-2 respecto de los controles incubados a la misma temperatura en ausencia de la enzima desfosforilante. Cuando el tratamiento con fosfatasa alcalina se realizó a 37 C se observó un incremento del 57 % ($p<0.001$) de la actividad de 11β–HSD-2 respecto de los microsomas controles incubados a la misma temperatura. La disminución de la actividad de 11β–HSD-2 debida al pretratamiento a 37 C también se ha observado en otros sistemas enzimáticos de citocromos esteroidogénicos por inactivación de los mismos, por esa razón se realizaron controles a 0 y 37 C.

Estos resultados indicarían que la desfosforilación produce una activación de la 11β–HSD-2 en forma directa o mediada a través de alguna/s otra/s proteína/s que interactúa/n con ella. Esto está en estrecha correlación con los resultados anteriores que indicarían que existen proteínas kinasas probablemente del tipo PKA que estarían involucradas en la regulación de la actividad de 11β–HSD.

La actividad de la fosfatasa alcalina utilizada se controló utilizando para ello el sustrato cromogénico *p*-nitrofenilfosfato en el buffer utilizado para estos ensayos (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 8.0) y en el buffer óptimo para la determinación de esta actividad (buffer dietanolamina 1 M, pH: 10) observándose actividad de fosfatasa alcalina en el buffer de ensayo, aunque ésta sólo es el 17 % de la actividad de la fosfatasa alcalina en buffer dietanolamina.

Efecto de la actividad de PKA *in vitro* sobre la actividad de 11β–HSD

Una vez observado que los procesos de defosforilación sobre la fracción microsomal podían, en forma directa o indirecta, aumentar la actividad enzimática de 11β–HSD-2 se estudió si el proceso de fosforilación podía ser mediado por PKA exógena y así reproducir sus efectos sobre la actividad enzimática de 11β–HSD. Para ello, microsomas de adrenal de rata normales fueron pretratados con la subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino y ATP. Posteriormente se ensayó la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD utilizando dichos microsomas pretratados como fuente enzimática.

En la Fig. 3.4.6 se observa que el pretratamiento de los microsomas con PKA y ATP produjo un leve incremento no significativo de la actividad de 11β–HSD ($p < 0.1$). H-89, inhibidor específico de PKA, no tuvo efecto por sí sólo y tampoco revirtió el efecto de PKA. Esto último podría indicar que el leve efecto observado con PKA podría no deberse a esa enzima y sí tal vez a algún contaminante de la preparación enzimática utilizada como por ejemplo alguna proteasa.

Previamente se habían realizado experimentos de fosforilación *in vitro* con la subunidad catalítica de la PKA y Kemptido (sustrato sintético de la PKA) como se detalló en Materiales y Métodos. Estos controles indicaron que: 1. El DMSO utilizado como

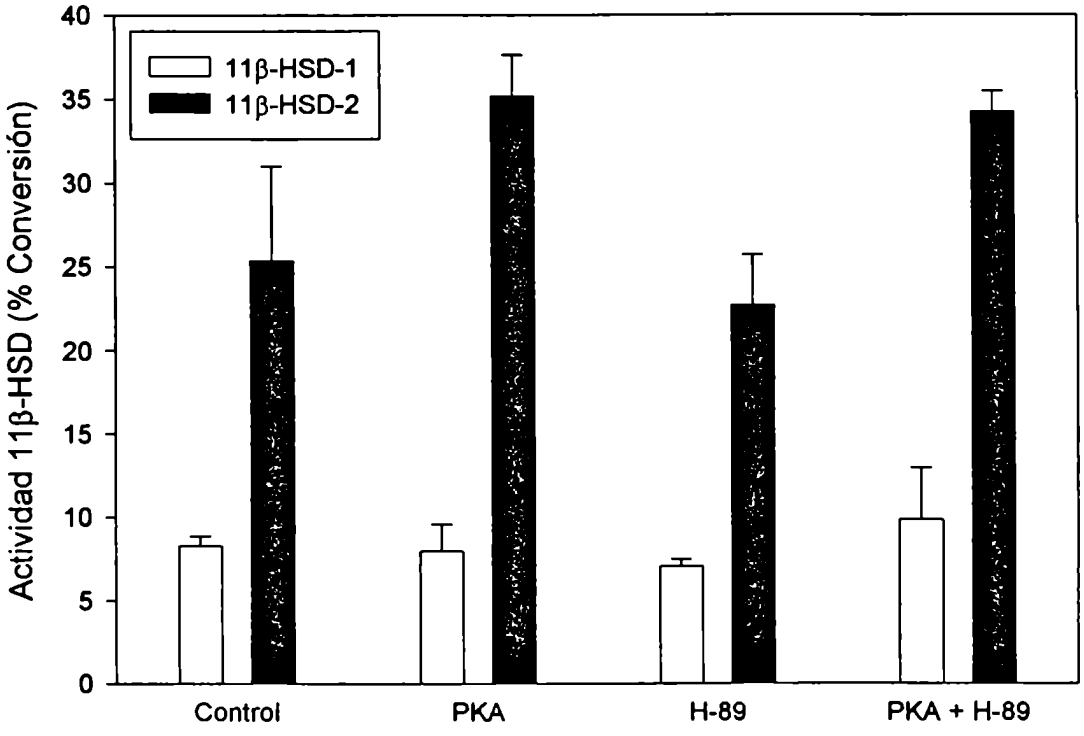


Fig. 3.4.6. Efecto de la fosforilación con PKA sobre la actividad de 11β-HSD-2 microsomal. 25 μg de proteína microsomal adrenal se incubaron con la subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino (1 U) y ATP (100 μM), en presencia o ausencia de H-89 (0.5 μM) durante 15 min a 30 C. Luego se adicionó adicionó [^{3}H]-corticosterona y NAD^+ o $NADP^+$para la determinación de la actividad de 11β-HSD como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

solvente de H-89 no modifica la actividad de PKA y, 2. H-89 0.5 μM reduce la actividad de PKA en un 70 %. Estos resultados refuerzan la posibilidad de que el efecto observado con H-89 y PKA en la fosforilación de los microsomas no sea debido a la actividad de PKA. También se realizaron experimentos de fosforilación con inhibidores de fosfatasas para mantener a los sustratos en el estado fosforilado luego de la reacción. Sin embargo, se observó que todos ellos: fluoruro de sodio (100 mM), ortovanadato de sodio (1 mM) y pirofosfato de sodio (10mM) inhibían parcialmente a la actividad fosforilante de PKA por lo que se descartó su uso (datos no mostrados).

Fosforilacion *in vitro* de la 11β-HSD-2 con [γ-^{32}P]-ATP

Con el objeto de estudiar si la 11β–HSD-2 es sustrato de la PKA se realizaron estudios de fosforilación *in vitro* con microsomas de adrenal de rata y la subunidad catalítica de la PKA en presencia de [γ-^{32}P]-ATP. Las proteínas microsomales fueron posteriormente solubilizadas, inmunoprecipitadas con anticuerpo anti 11β-HSD-2 de rata, separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y expuestas a una película radiográfica. Posteriromente la membrana de nitrocelulosa fue procesada mediante la técnica de Western-blot para 11β–HSD-2 con el fin de determinar exactamente la posición de la banda correspondiente a dicho polipéptido.

En el panel A de la Fig. 3.4.7 se observa el Western-blot correspondiente a la inmunoprecipitación donde se visualiza la banda correspondiente a 11β–HSD-2; las otras dos bandas corresponden a las cadenas pesada y liviana de las inmunoglobulinas utilizadas en la inmunoprecipitación. En el panel B de la Fig. 3.4.7 se observa la autoradiografía de la corrida electroforética de la inmunoprecipitación. PKA fosforiló una serie de sustratos endógenos como se observa en la calle 1 donde se corrió la fracción microsomal fosforilada *in vitro* con PKA sin inmunoprecipitación previa. Luego de la inmuprecipitación se observó una importante disminución en el número de bandas indicando la eficiencia del tratamiento (calle 3). Cuando se incubaron microsomas con [γ-^{32}P]-ATP en ausencia de PKA se observó principalmente una banda correspondiente a un polipéptido fosforilado de PM 65 kDa que no corresponde a la 11β–HSD-2 por presentar un PM mayor al esperado (calle 2). Esta banda se observa en todos los carriles y estaría indicando que se debería a la acción de una proteína kinasa endógena microsomal. Cuando la fracción microsomal fue incubada con PKA y [γ-^{32}P]-ATP se observó una serie de bandas lo cuál sería indicativo de que en la inmunoprecipitación hubo precipitación de otras proteínas no específicas pero ninguna de ellas corresponde con el PM de la 11β–HSD-2 (calle 3). El patrón de bandas observado en la calle 3 no se observó cuando los microsomas se incubaron con PKA, [γ-^{32}P]-ATP y un exceso del sustrato sintético específico del la PKA (Kemptido) indicando que las bandas antes observadas se debían a la acción específica de la PKA (calle 4). En este caso sólo se observó la banda también visualizada en ausencia de PKA (calle 2) indicando que la

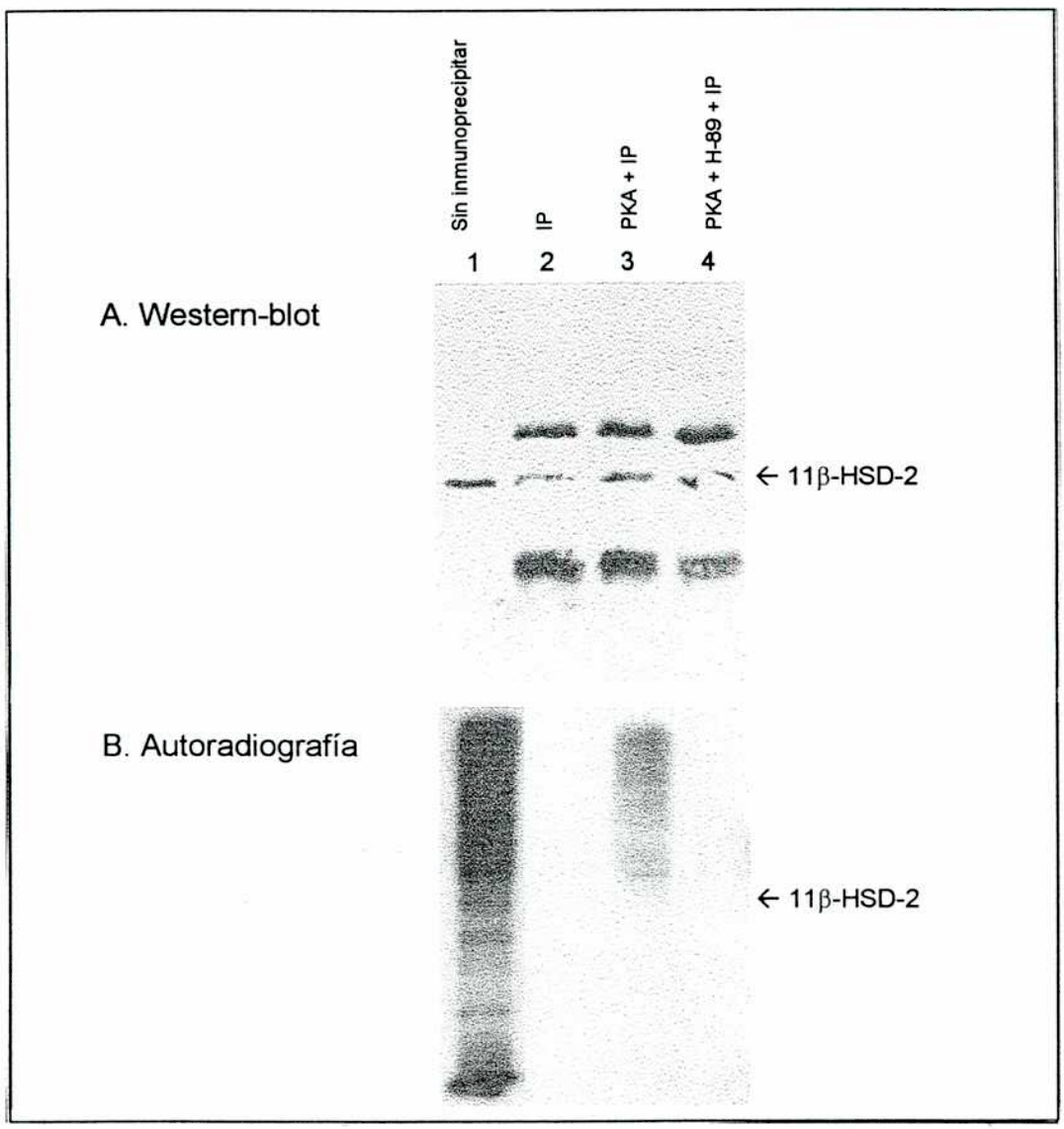


Fig. 3.4.7. Fosforilación de la 11β-HSD-2 por PKA. 120 μg de proteína microsomal adrenal fueron incubadas con la subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino (2 U) (calles 3-4) y [γ-^{32}P]-ATP (5.10^7 cpm) durante 15 min a 30 C. Luego fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico contra 11β-HSD-2 de rata (calles 2-4) y proteína G inmovilizada. Las proteínas (inmuno)precipitadas fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida de 12.5 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se expuso a una película radiográfica y posteriormente se reveló mediante la técnica de Western-blot utilizando el mismo anticuerpo usado para la inmunoprecipitación. calle 1: fosforilación con PKA, sin inmunoprecipitar, calle 2: fosforilación sin PKA, calle 3: fosforilación con PKA, calle 4: fosforilación con PKA en presencia de Kemptido 100 nM.

proteína kinasa involucrada en esta fosforilación no sería del tipo PKA. Estos resultados estarían indicando que la 11β–HSD-2 no sería sustrato de la PKA.

Discusión

La inhibición causada por ACTH sobre la actividad de 11β–HSD en células dispersas de fasciculata adrenal de rata sería mediada por la acción de una proteína kinasa ya que este efecto es inhibible por un inhibidor genérico de las proteinas kinasas como la staurosporina [537,538,540] (Fig. 3.4.1). Concentraciones de 1μM staurosporina inhibieron completamente la secreción de glucocorticoides y revirtieron el efecto inhibitorio de ACTH sobre la 11β–HSD. Resultados similares fueron observados con el inhibidor específico de PKA H-89 [541,542], indicando que ACTH podría estar ejerciendo su efecto sobre la 11β–HSD a través de una proteína kinasa A (Fig. 3.4.2). El inhibidor específico de la proteína kinasa C, B-I [543,544], no revirtió el efecto de ACTH sobre la 11β–HSD adrenal indicando que probablemente este efecto no sea mediado por esta proteína kinasa (Fig. 3.4.3). Sin embargo, concentraciones de 10 μM de B-I inhibieron la corticosteroidogénesis en un 50 % sugiriendo que este camino metabólico no sólo es regulado por la PKA sino que otras proteínas kinasas (posiblemente PKC) se hallan involucradas como ya ha sido postulado por diversos autores [463,521,526-528] y comentado anteriormente (ver más arriba).

La posible intervención de la PKA en la regulación de la 11β–HSD adrenal se ve reafirmada en los experimentos con db-cAMP donde se observa que este activador selectivo de la PKA puede simular parcialmente el efecto de ACTH. El db-cAMP estimula la esteroidogénesis en forma dosis dependiente y a concentraciones de 1 mM reduce la actividad de 11β–HSD en un 33 % (Fig. 3.4.4).

Cuando microsomas de adrenal de rata fueron tratados previamente con fosfatasa alcalina *in vitro* la actividad de 11β–HSD-2 mostró un importante incremento (Fig. 3.4.5). Estos experimentos *in vitro* indican nuevamente que la actividad de 11β–HSD podría ser regulada por procesos de fosforilación-desfosforilación que actuen sobre ella de forma directa o indirecta a través de otra proteína microsomal que interactúa con la 11β–HSD-2

Cuando se ensayó la fosforilación *in vitro* de la fracción microsomal con PKA se observó que esta proteína kinasa no modificó la actividad enzimática de ninguna de las

dos isoformas de la 11β–HSD (Fig. 3.4.6). Por lo tanto, a partir de esta estrategia experimental no es posible confirmar nuestra hipótesis ni obtener mayor detalle de información, aunque el resultado sugiere fuertemente que la fosforilación mediada por PKA no sería sobre la molécula de 11β-HSD *per se* (Fig. 3.4.7) sino más bién sobre otra/s proteína/s que así, indirectamente, regularían la actividad de la enzima mencionada. Por lo tanto, en la inhibición causada por ACTH de la 11β–HSD-2 estaría involucrada una proteína kinasa inhibible por H-89 del tipo PKA pero o bién no sería exactamente la PKA, o al menos reproducible por la PKA de corazón bovino, o que requiere de algún otro factor soluble no asociado a la membrana microsomal.

Diversas enzimas del metabolismo del colesterol [545-548] y esteroidogénicas [549-556] son regulables por mecanismos de fosforilación-desfosforilación.

En efecto, en el hígado, principal órgano de síntesis y metabolismo del colesterol, las enzimas clave son reguladas por fosforilaciones [547]. La HMG-CoA reductasa, la principal enzima regulatoria de la síntesis de colesterol, es inhibida por fosforilación [546]. En forma contraria, la acil CoA:colesterol O-aciltransferasa (ACATasa) y la 7α-hidroxilasa del colesterol, enzimas regulatorias de los mecanismos de utilización del colesterol, son activadas por la fosforilación [545,548]. Se postula que la regulación aguda de los niveles intracelulares de colesterol no-esterificado se logra mediante la coordinación de los mecanismos de fosforilación-desfosforilación de estas tres enzimas. Así, cuando hay disponibilidad de colesterol en las células del hígado, la HMG-CoA reductasa se halla inhibida por fosforilación y consecuentemente reducida la síntesis de colesterol; sin embargo, las reacciones que utilizan colesterol se hallan activadas, debido a la fosforilación de la ACATasa y la 7α-hidroxilasa del colesterol. Por lo tanto, la fosforilación-desfosforilación de estas tres enzimas clave provee un mecanismo de homeostasia del colesterol no-esterificado intracelular.

Dentro de las enzimas esteroidogénicas, también se ha observado regulación por fosforilación-desfosforilación de los citocromos P-450_{scc} [549,557], P-$450_{11\beta}$ [555,556], P-450_{c17} [550,553] y P-450_{aro} [554]. En 1975, Caron M.G. *et al.* [549] informaron la modificación de la actividad del citocromo P-450_{scc} en un sistema reconstituido a partir de la enzima purificada, adrenodoxina y adrenodoxina reductasa por fosforilación. En este sistema, la incubación con PKA parcialmente purificada, cAMP y ATP produjo un

incremento del 40 % en la actividad enzimática del citocromo P-450_{scc}. Estos autores, también observaron la incorporación de ^{32}P en el citocromo a partir de [γ-^{32}P]-ATP en presencia de PKA en forma dependiente del agregado de cAMP. Posteriormente, otros autores observaron resultados similares [557] que no fueron avalados en sucesivos estudios [555,558] que no hallaron incorporación de [γ-^{32}P]-ATP mediado por proteínas kinasas dependientes (PKA) o independientes de cAMP (caseína kinasa). Más recientemente, se observó la fosforilación del citocromo P-450_{scc} en un sistema reconstituido por la PKC, la cual fue dependiente de Ca^{2+}, fosfatidilserina y dioleina [551]. Probablemente, la presencia de vestigios de PKC u otras kinasas en las preparaciones de proteínas kinasas fosforilantes en los estudios antes mencionados sean la causa de la discrepancia en los resultados hallados.

El citocromo P-$450_{11\beta}$ es fosforilado por la PKA en presencia de ATP y cAMP en un sistema reconstituido con el citocromo purificado [555,556]. La fosforilación de este citocromo no modifica su afinidad por el sustrato, la deoxicorticosterona, pero sí modifica su afinidad por la adrenodoxina reduciendo el K_m del citocromo respecto de la proteína transportadora de electrones en un 40 % [555].

En el caso del citocromo P-450_{c17}, se observó que cuando su cDNA se expresa en células NCI-H295 se halla fosforilado y que el grado de esta modificación post-traduccional se halla incrementada por tratamientos con db-cAMP de las células [553]. Cuando el cDNA del P-450_{c17} se expresa en células COS-1 el producto proteico es una fosfoproteína que nuevamente presenta un incremento en su nivel de fosforilación por tratamiento de los cultivos celulares con db-cAMP o por cotransfección con un plásmido conteniendo el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA. Por el contrario, la incubación de esta línea celular transfectada con ésteres de forbol, activadores de la PKC, no modificá el nivel de fosforilación del citocromo P-450_{c17}. Sin embargo, cuando el cDNA del citocromo P-450_{c17} se expresó en la línea célular Kin 8, derivada de la línea celular adrenocortical de ratón Y1 pero que carece de la subunidad regulatoria de la PKA, se obtuvo un producto proteico no fosforilado aún en células cotransfectadas con un plásmido conteniendo el cDNA de la subunidad catalítica de la PKA. Según los autores [553], esto indicaría que el citocromo P-450_{c17} es fosforilado por una vía dependiente de cAMP pero no por la PKA directamente. Respecto de la influencia de la fosforilación en la actividad

del citocromo P-450$_{c17}$, se observó que las células COS-1 transfectadas con el cDNA del P-450$_{c17}$ presentan un incremento en su actividad enzimática al ser cotransfectadas con la subunidad catalítica de la PKA.

Estos resultados son similares en parte a los observados en los experimentos presentados en esta sección con la 11β-HSD-2 de adrenal de rata donde se observó que su inhibición es mediada por un mecanismo que involucra a proteínas kinasas (experimentos con staurosporina) posiblemente PKA (experimentos con H-89) activada por cAMP (experimentos con db-cAMP) pero que su actividad no se regula directamente por fosforilación con la PKA *in vitro* (experimentos de fosforilación *in vitro* y determinación de actividad de 11β-HSD-2) ni es sustrato de fosforilación de ésta (experimentos de fosforilación *in vitro*).

Cuando los microsomas de las células transfectadas con el P-450$_{c17}$ son tratados *in vitro* con fosfatasa alcalina presentan una importante reducción en su actividad enzimática de 17,20 liasa aunque no en la actividad de 17α-hidroxilasa [553]. Por otro lado, Löhr J.B. y Kühn-Velten W.N. [550] realizaron estudios *in vitro* del citocromo P-450$_{c17}$ con microsomas de testículo de rata en los que determinaron su interacción con el sustrato fisiológico, la progesterona, mediante espectroscopía. La interacción ligando-proteína se incrementa en presencia de ATP, lo que estaría indicando una fosforilación del citocromo. Sin embargo, esta interacción no se modifica por el agregado exógeno de la subunidad catalítca de la PKA ni de la fracción citosólica de los homogenatos de testículo. Estos resultados indicarían que la proteína kinasa involucrada es microsomal. Estudios de estabilidad del citocromo P-450$_{c17}$ durante 3 hs indicaron que su actividad no se modifica por la presencia de ATP o de la fracción citosólica pero sí de ambas conjuntamente. La inactivación del P-450$_{c17}$ sería mediada por proteólisis ya que este efecto es bloqueado por inhibidores de proteasas (PMSF y AEBSF) pero también por inhibidores de la PKA como KT5720. Estos últimos resultados indican nuevamente que la PKA se halla involucrada en la regulación de este citocromo aunque en forma indirecta, a través, posiblemente, de la activación de una proteasa citosólica.

Esto es semejante a lo hallado en nuestro trabajo en células de fasciculata adrenal de rata donde la PKA se halla involucrada en la regulación de la 11β-HSD-2 en forma indirecta.

La 11β-HSD-2 de rata podría ser fosforilada ya que presenta sitios consenso de fosforilación para varias proteínas kinasas. La búsqueda en la base de datos de secuencias de fosforilación PhosphoBase [559] arrojó potenciales sitios de fosforilación para la 11β-HSD-2 de rata que se detallan en la Tabla 3.4.2. Estas predicciones hacen posible que la 11β-HSD-2 de rata sea fosforilada por otras proteínas kinasas a su vez reguladas por PKA.

Tabla 3.4.2: Potenciales sitios de fosforilación de la 11β-HSD-2 de rata.

Proteína kinasa	Secuencia consenso de fosforilación	Potencial sitio de fosforilación de la 11β-HSD-2 de rata
PKA	R-X_{1-2}-T-X [560]	S-129, S-210, T-216 y T-340
PKC	(X-S/T-X-R/K [561]	T-98, S-129, T-184, T-234, S-310 y T-340
Proteína kinasa II dependiente de calmodulina	R-X-X-S/T-X [560]	T-216 y T-340
Caseína kinasa I	Sp/Tp-X_{2-3}-S/T-X [562]	T-92, T-112, T-156, T-184, T-219, S-219, T-271 y T-340
Caseína kinasa II	X-S/T-X-X-D/E [561]	T-88, T-112, T-140, T-184 y T-387

En la Fig. 3.4.8 se presenta un gráfico que resume las posibilidades emergentes de los resultados obtenidos de la regulación de la 11β-HSD por ACTH en las células de fasciculata adrenal de rata. La molécula de ACTH se une a su receptor que mediante una proteína G_s activa a la adenilato ciclasa que produce cAMP a partir de ATP. El cAMP activa a la PKA. Los experimentos con staurosporina, H-89 y db-cAMP que indican la mediación del efecto de ACTH por la vía del cAMP-PKA. Posteriormente, la PKA

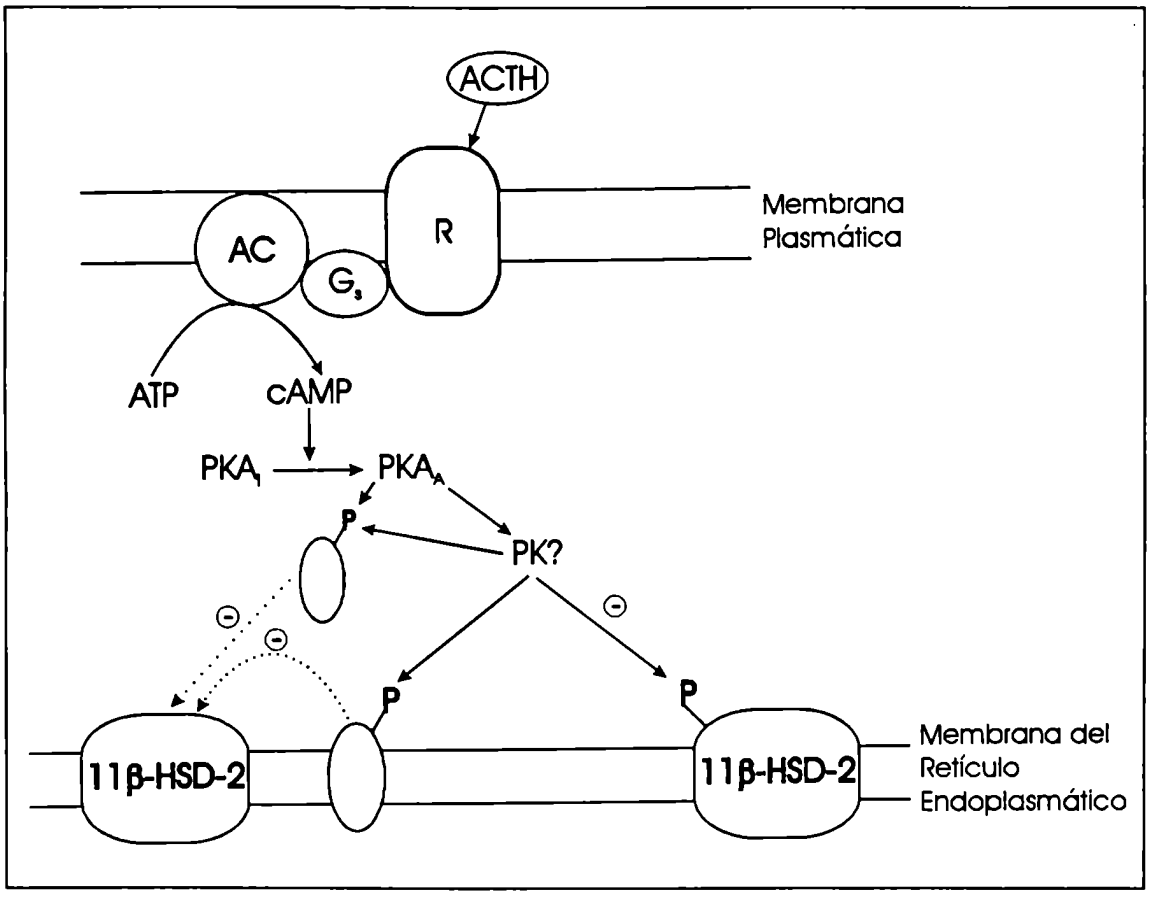


Fig. 3.4.8. Modelo propuesto del mecanismo de señalización intracelular que lleva a la inhibición de la actividad de 11β-HSD-2. R: receptor a ACTH; G_s: proteína G estimulatoria; AC: adenilil ciclasa; PKA_I: PKA inactiva; PKA_A: PKA activa; PK?: proteína kinasa intermediaria postulada.

podría activar a otra proteína kinasa que a su vez, fosforilaría directamente a la 11β-HSD-2 o a otra proteína de la membrana microsomal que interactuaría con ésta. La PKA está involucrada pero no actuaría directamente sobre la fracción microsomal porque no modifica la actividad de la 11β-HSD-2. Sin embargo, en la fracción microsomal, la 11β-HSD-2 u otra proteína que interactúa con ésta se halla fosforilada porque la desfosforilación con fosfatasa alcalina produce una modificación en la actividad de 11β-HSD-2. En el úlimo paso se postulan dos posibilidades ya que la 11β-HSD-2 podría ser fosforilada directamente o existir otra proteína intermediaria, como se mencionó recién. Estas son sólo algunas de las posibilidades dentro de un amplio rango. Por otro lado, cabe destacar, que la vía del cAMP-PKA parecería estar involucrada pero esto no permite descartar a ninguna de las otras vías de señalización

intracelular que median el efecto de ACTH, como así tampoco permite indicar que esta vía sea la principal para la regulación de la actividad de la 11β-HSD. Simplemente, la vía cAMP-PKA parecería estar involucrada en la regulación de la actividad enzimática de la 11β-HSD adrenal de rata.

Desde los primeros trabajos de Lakshmi V. y Monder C. [505] se observó que la 11β-HSD-1 presenta como característica distintiva el fenómeno de latencia que es el desarrollo de mayor actividad en homogenatos con ciertos tratamientos que en el homogenato original. Este incremento de actividad puede producirse por diversos tratamientos como ser adición de detergentes, congelado y descongelado, conservación a 5 C durante 24 hs o adición de glicerol también durante 24 hs [183,495,505]. Por otro lado, es de destacar que la 11β-HSD-2 de adrenal de rata mostró también un fenómeno de latencia ya que su actividad se incrementa con el paso del tiempo al ser guardada diluida en glicerol 50 % a – 20 C. Teniendo en cuenta este nuevo fenómeno (datos personales no mostrados) y que la 11β-HSD-2 es regulada en forma directa o indirecta por fosforilación-desfosforilación y la desfosforilación produce un incremento de su actividad, es factible pensar en la existencia fostatasas microsomales [554] que desfosforilen a este citocromo durante su conservación y esto sea, entre otras causas, uno de los factores causantes de este fenómeno de latencia.

Sección 5: 11β–HSD bovina: 11β–HSD-2 en adrenal bovina. Clonado y expresión de la 11β–HSD-2.

Existen muy escasos datos en la literatura sobre las características, estructura y función de la 11β–HSD bovina. La actividad de 11β–HSD-2 fue detectada en fibroblastos cardíacos bovinos pero no en cultivos de células endoteliales [563]. Esta actividad enzimática se observó en células enteras y homogenatos con corticosterona pero no con cortisol como sustrato. Williams A.C. *et al.* [518] investigaron los niveles secretados de cortisol y cortisona por células de fasciculata adrenal bovina en cultivo lo cuál es una medida indirecta de la actividad de 11β–HSD. Preincubaciones de estas células con ACTH durante 24 hs producen una disminución en la relación cortisol/cortisona secretada lo cual indicaría no sólo la presencia de 11β–HSD (muy probablemente del tipo 2) en estas células sino además una regulación de esta actividad por ACTH.

El interés del estudio de la 11β–HSD bovina en adrenales radica en que: i) el uso de cultivos celulares primarios de células adrenocorticales bovinas es un modelo ampliamente difundido en el estudio de la función adrenal y ii) si bien la batería enzimática de producción de corticosterona y aldosterona es similar en la rata y el humano, la adrenal bovina posee actividad de 17α-hidroxilasa produciendo entonces cortisol como principal glucocorticoide, a diferencia de la adrenal de rata que no posee esta actividad enzimática por lo que no produce cortisol, y entonces su principal glucocorticoide es la corticosterona. Esto lleva a que la rata y el ratón presenten un patrón hormonal de secreción de glucocorticoides diferente al observado en humanos y otros mamíferos incluyendo los bovinos. Como primer paso en el estudio de la 11β–HSD adrenal bovina se analizaron algunas características bioquímicas. Posteriormente, se realizó el clonado, expresión y caracterización de la 11β-HSD-2 bovina.

Actividad 11β–HSD en adrenal bovina

Con el fin de determinar las isoformas de 11β–HSD presentes en la adrenal bovina se realizaron incubaciones utilizando como fuente de enzima la fracción microsomal de la

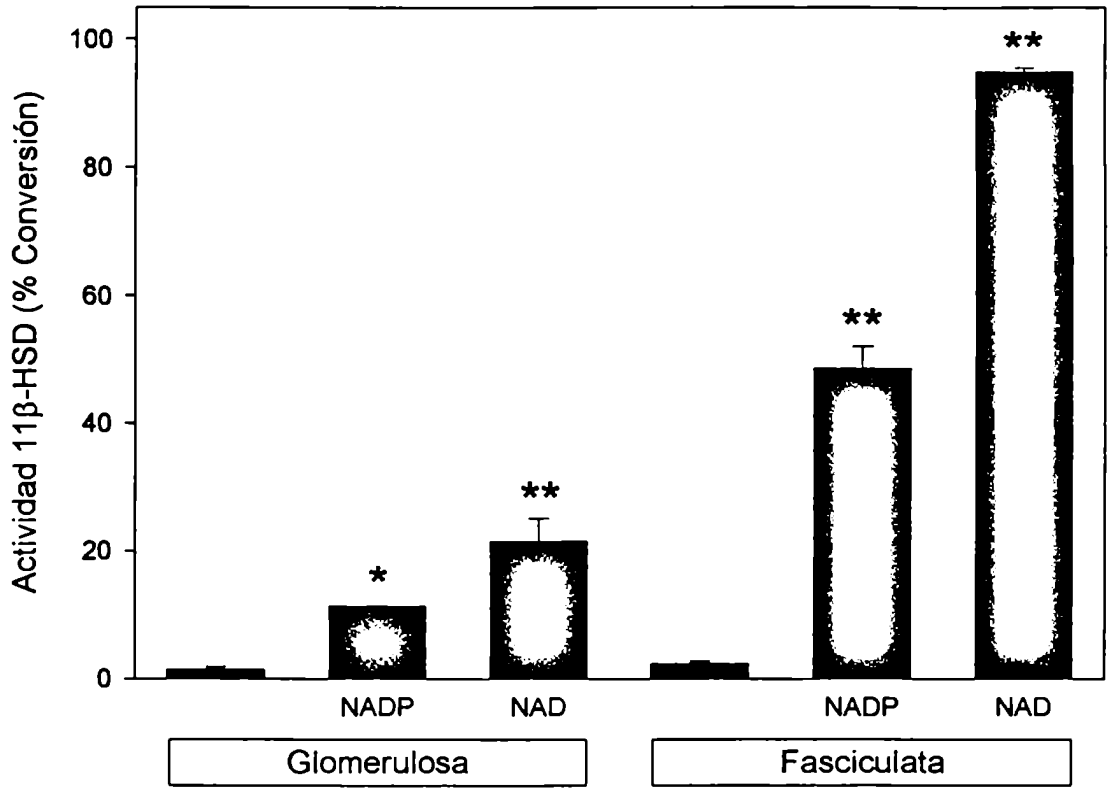


Fig. 3.5.1. Actividad de 11β-HSD en microsomas de adrenal bovina. 20 μg de proteína microsomal de las fracciones enriquecidas en la zona glomerulosa (capa 1) o fasciculata (capa 2) fueron incubadas con 200.000 dpm de [^{3}H]-cortisol y NAD^+ o $NADP^+$ 0.5 mM durante 15 min a 37 C. Posteriormente se determinó la actividad de 11β-HSD como se detalla en *Materiales y Métodos* que se expresa como porcentaje de conversión de cortisol en cortisona. Los valores se presentan como Media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, respecto del control sin agregado de cofactor para cada zona ensayada.

primera y segunda capa de 500 μm de la glándula adrenal bovina, correspondientes a fracciones enriquecidas en zona glomerulosa y zona fasciculata respectivamente [564]. En dichas incubaciones se adicionó [^{3}H]cortisol como sustrato y NAD^+ o $NADP^+$ como cofactores. En la Fig. 3.5.1 se observa que la conversión de cortisol en cortisona en presencia de 20 μg de proteína y $NADP^+$ alcanza valores de 11.3 ± 0.2 y 48.7 ± 3.4 % en las zonas glomerulosa y fasciculata respectivamente sugiriendo la presencia de 11β–HSD-1 en adrenal bovina. Por otro lado, la misma cantidad de extracto proteico produce una conversión de 21.6 ± 9.6 y 94.9 ± 0.5 % en las zonas glomerulosa y fasciculata respectivamente utilizando NAD^+ como cofactor sugiriendo la presencia de 11β–HSD-2. Para ambas isoformas la actividad es aproximadamente 4.4 veces mayor en la zona fasciculata con respecto a la zona glomerulosa. Por otro lado, en las dos zonas

adrenales la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD es fuertemente dependiente del agregado de cofactores exógenos, es decir que, a diferencia de lo observado en adrenal de rata las conversiones en ausencia de NAD^+ o $NADP^+$ fueron casi nulas.

Actividad de la 11β-HSD de adrenal bovina por corticosterona y cortisol. Comparación con rata.

Se realizaron estudios comparativos de la actividad enzimática de ambas isoformas de 11β–HSD de fasciculata adrenal de rata y vaca utilizando como sustratos cortisol y corticosterona. El objetivo de estos estudios fue analizar la capacidad de cada especie de utilizar ambos sustratos sabiendo que corticosterona y cortisol son los principales glucocorticoides de la rata y la vaca respectivamente. En la Fig. 3.5.2 se observan curvas de porcentaje de conversión de corticosterona en 11-dehidrocorticosterona y de cortisol en cortisona en función de concentraciones crecientes de proteína microsomal para la actividad de 11β-HSD en presencia de NAD^+ y $NADP^+$ de vaca y rata. En microsomas de adrenal de rata se observa que utilizando corticosterona como sustrato (Fig. 3.5.2-A) la 11β–HSD-2 alcanza un porcentaje de conversión de 39.1 % con 50 μg de proteína mientras que con la misma cantidad de proteína se obtiene un 4.9 % de conversión correspondiente a la actividad de 11β–HSD-1. Ambas isoformas de 11β–HSD de rata fueron incapaces de utilizar cortisol como sustrato en todo el rango de concentraciones proteicas ensayado (Fig. 3.5.2 B). Al analizar la actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD bovina en microsomas de fasciculata adrenal se observó que ambos sustratos, corticosterona y cortisol, son utilizados por las dos isoformas de 11β–HSD (Fig. 3.5.2 C-D). La 11β–HSD-1 bovina (10 μg de proteína microsomal) produce una conversión de 16.3 y 3.4 % usando corticosterona y cortisol como sustratos respectivamente; mientras que la 11β–HSD-2 (10 μg de proteína microsomal) bovina presenta una actividad enzimática que alcanza valores de conversión de 87.4 y 30.8 % de corticosterona y cortisol en sus productos 11-oxidados respectivamente (Fig. 3.5.2 panel C-D). Las 11β–HSD-1 y 11β–HSD-2 adrenales bovinas presentaron una actividad de

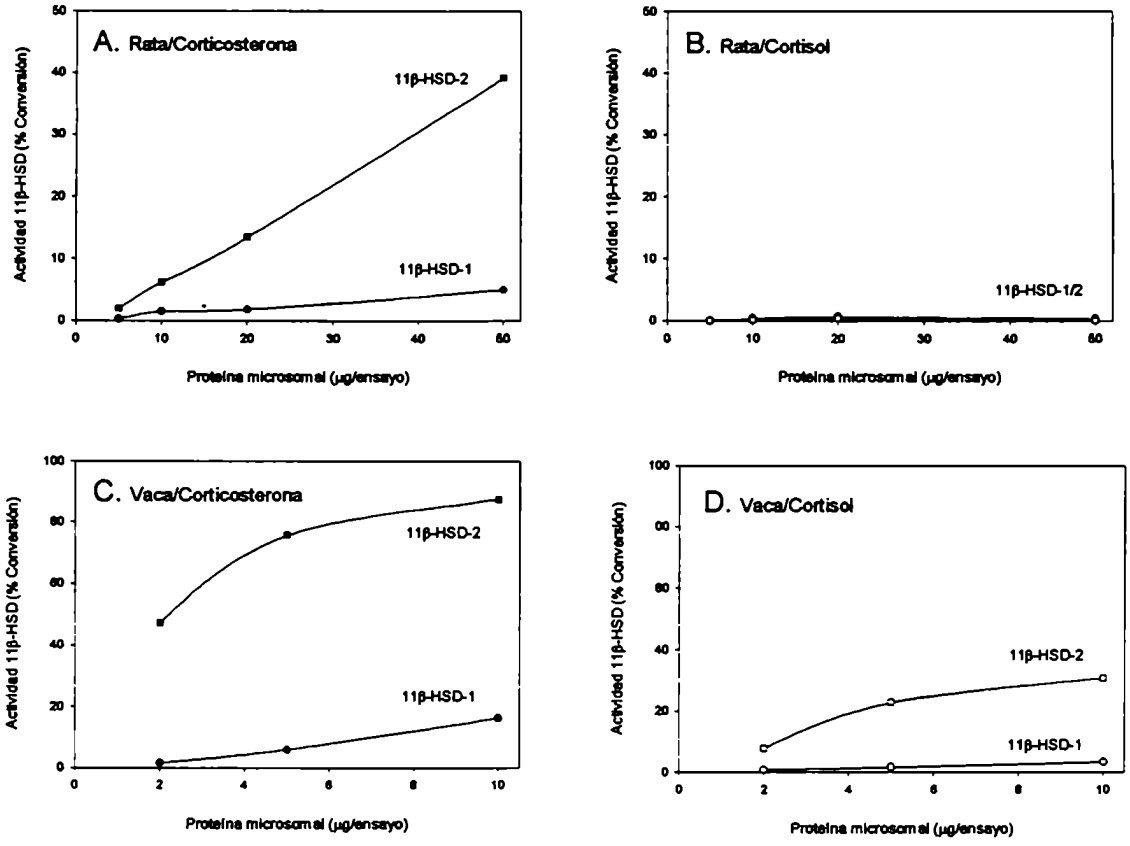


Fig. 3.5.2. Especificidad de sustratos de ambas isoformas de 11β-HSD en microsomas de adrenal de rata y vaca. Concentraciones crecientes de proteína microsomal adrenal de rata ("core") (panel A y B) o vaca (capa 2) (panel C y D) fueron incubadas con [^{3}H]-corticosterona (panel A y C) o [^{3}H]-cortisol (panel B y D) y NAD^+ o $NADP^+$ como cofactor . La actividad de 11β-HSD se determinó como se detalla en *Materiales y Métodos* y se expresó como como porcentaje de conversión de los sustratos 11-reducidos en sus respectivos productos 11-oxidados. Los valores se presentan como medias de dos experimentos realizados por duplicado.

deshidrogenasa 4.8 y 2.8 veces mayor con corticosterona que con cortisol como sustrato respectivamente.

Estudios de inhibición de la 11β-HSD-2 de vaca y rata por corticosterona, cortisol y sus derivados 11-oxidados.

La caracterización de 11β–HSD-2 microsomal adrenal incluyó estudios de inhibición de la transformación de sustratos radiactivos por sustratos 11-reducidos (corticosterona y cortisol) radioinertes y sus correspondientes productos 11-oxidados (11-dehidrocorticosterona y cortisona) en estudios comparativos entre rata y vaca. Para

ello, microsomas de fasciculata adrenal de rata o vaca se incubaron con concentraciones crecientes de los compuestos a estudiar y [^{3}H]corticosterona como sustrato, determinándose la actividad enzimática de 11β–HSD-2. En la Fig. 3.5.3 se observan los resultados obtenidos con microsomas de rata (panel A) y vaca (panel B) graficados como % del control sin el agregado de compuestos. La 11β–HSD-2 de rata presentó valores de IC_{50} de 0.014, 0.280, 0.316 y 6.310 μM para corticosterona, cortisol, 11-dehidrocorticosterona y cortisona respectivamente. Por otro lado, la 11β–HSD-2 microsomal bovina presentó valores de IC_{50} de 0.0025, 0.047, 0.237 y 1.260 μM para corticosterona, cortisol, 11-dehidrocorticosterona y cortisona respectivamente.

Estos resultados indican que en ambas especies animales corticosterona es más afín a la enzima que cortisol, mientras que la inhibición por producto presenta mayor afinidad por 11-dehidrocorticosterona.

Marcado por fotoafinidad de la 11β-HSD-2.

Con el fin de caracterizar la 11β-HSD-2 de adrenal de rata y vaca se realizó un marcado por fotoafinidad de la fracción microsomal adrenal de ambas especies. Esta técnica permite obsevar en forma directa la interacción del péptido de la 11β-HSD-2 con su sustrato como también la acción de inhibidores de su actividad enzimática.

Brown R.W. *et al.* [229] han descripto una técnica de marcado por fotoafinidad de la 11β–HSD-2 de placenta humana lo que permitió su purificación y caracterización . En este trabajo, se empleó una técnica similar para el marcado de la 11β–HSD-2 en la fracción microsomal de adrenal de vaca y rata. Para ello, microsomas de fasciculata adrenal de rata o vaca fueron incubados con 1 μCi de [^{3}H]corticosterona (aprox. 125 nM) bajo luz UV de 312 nm durante 15 min a 37 C. Posteriormente se agregó acetona y los polipéptidos precipitados fueron analizados mediante SDS-PAGE. El gel fue tratado por la técnica de fluorografía y expuesto a una placa radiográfica. En la calle correspondiente a los microsomas de adrenal bovina incubados en presencia de 0.5 mM NAD^+ se observó una banda única de un PM de aproximadamente 36 kDa. La banda observada es de muy baja intensidad por lo que no se presenta la foto de la autoradiografía; la banda es observable a simple vista pero debido al bajo contraste no es

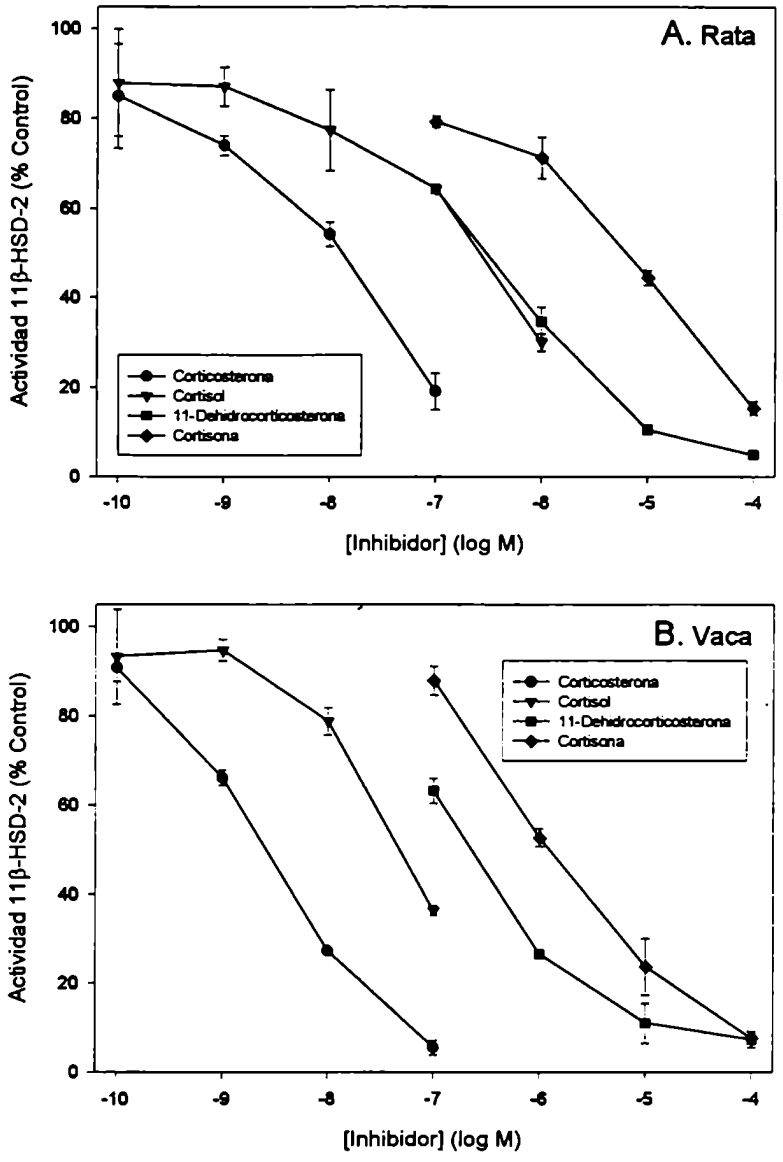


Fig. 3.5.3. Inhibición de la actividad de 11β-HSD-2 de rata y vaca por corticosterona, cortisol y sus derivados 11-oxidados. Microsomas de adrenal de rata (20 µg de proteína, "core") (panel A) o vaca (1 µg de proteína, capa 2) (panel B) fueron incubados con [^{3}H]-corticosterona, NAD^+ y concentraciones crecientes de corticosterona, cortisol, 11-dehidrocorticosterona o cortisona radioinertes. La actividad de 11β-HSD-2 se determinó como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad respecto del control sin el agregado de esteroides radioinertes. Los valores se presentan como Medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

visible aún en un scanneo con un densitómetro laser. Esta banda no se observa cuando las incubaciones para el marcado se realizan en ausencia de cofactor o con un exceso de corticosterona radioinerte (10 µM, ~ 100 veces de exceso) o en presencia de 50 µM

carbenexolona (inhibidor específico de la 11β–HSD). Estos últimos resultados apoyan que la banda observada es por interacción específica con la [^{3}H]-corticosterona.

En las incubaciones realizadas con microsomas de adrenal de rata no se observaron bandas en ninguno de los tratamientos, probablemente debido a una menor concentración de la 11β–HSD-2 de rata en la fracción proteica total.

Los resultados observados indican que la 11β-HSD-2 bovina presenta un comportamiento similar a su contraparte humana, presentando una muy alta afinidad por el sustrato.

Clonado, expresión y caracterización de 11β–HSD-2 bovina

Estrategia de clonado y aislamiento del cDNA de la 11β–HSD-2 bovina

Se diseñó una estrategia de clonado basada en la obtención de un fragmento interno de la secuencia del cDNA por PCR para luego obtener las secuencias de ambos extremos mediante la técnica de RACE.

La reacción inicial de PCR se realizó utilizando como molde la hebra complementaria del mRNA obtenida por transcripción reversa del mRNA total de riñón bovino y una serie de "primers" basados en la secuencia de humano, oveja y rata. Como se observa en la Fig. 3.5.9, que incluye al cDNA bovino posteriormente clonado, los cDNA de la 11β–HSD-2 de las distintas especies presentan un mayor grado de similitud en el comienzo de la región codificante, el que decrece a medida que se avanza hacia el extremo 3′. Debido a esto se tendería a elegir "primers" que se ubicaran en la región 5′ del mRNA para la realización de la reacción de PCR por ser una región más conservada. Sin embargo, existe el inconveniente de que el mRNA de la 11β–HSD-2 presenta un alto contenido en G+C especialmente en sus primeras 400 bases, el que decrece a medida que se avanza hacia el extremo 3′. Este alto contenido de G+C hace que el molde utilizado en la reacción de PCR adquiera plegamientos tridimensionales que dificultan la unión de los "primers" al molde y su posterior amplificación. Por lo tanto, en el cDNA de la 11β–HSD-2 existen dos gradientes opuestos que conllevan complicaciones prácticas para la realización de la reacción de PCR heteróloga; en el extremo 5′ hay un alto

contenido en G+C y en el extremo 3´ se presenta un menor grado de similitud entre los mRNA de distintas especies.

De los "primers" ensayados se obtuvo amplificación con un par basado en la secuencia humana de un fragmento de 627 bp (550-1177 bp, de la secuencia del cDNA de la 11β-HSD-2 bovina posteriormente clonado y secuenciado) que se ubica en la mitad 3´ de la región codificante 150 bp antes del codón STOP. Este fragmento de PCR fue purificado y secuenciado por Primer Sequencing Cycling. Utilizando otros "primers" internos a este fragmento se obtuvieron otros productos de PCR que también fueron secuenciados mostrando coincidencia absoluta con el antes mencionado. Se intentó obtener la secuencia codificante completa utilizando "primers" basados en la secuencia humana y de oveja cercanos al codón iniciación de la traducción y un "primer" específico a partir de la secuencia obtenida. No se obtuvo amplificación de fragmentos de tamaño esperado en ningún caso a pesar de probar las siguientes alternativas: a) Obtención del molde para PCR (hebra complementaria del cDNA) utilizando "primers" de poli(A), hexámeros al azar o un "primer" específico basado en la secuencia obtenida anteriormente, b) Realización de la síntesis de la hebra complementaria del cDNA a 42 C (standard) y a 50 C con el fin de eliminar posibles estructuras secundarias del mRNA, c) Realización de la reacción de PCR utilizando diversos programas de temperaturas y usando gradientes de temperaturas, dado que además se desconocía el grado de apareamiento de los "primers" heterólogos, y d) Utilizando distintas concentraciones del reactivo GC-Melt (Clontech) formulado para la amplificación por PCR de moldes con alto contenido en G+C.

En base a estos inconvenientes se decidió utilizar la técnica de RACE que permite amplificar los extremos de un cDNA conociendo la secuencia de un fragmento interno, lo que permite el diseño de "primers" específicos. Brevemente, la técnica de RACE consiste en la obtención de cDNA de doble cadena con los extremos romos al que se le agrega en ambos extremos un adaptador de secuencia conocida. Posteriormente, se realizan sendas reacciones de PCR para la amplificación de los extremos 5´ y 3´ utilizando "primers" que hibridan con el adaptador adicionado y la región interna de secuencia conocida. El producto de la reacción de PCR es posteriormente sometido a una nueva reacción denominada "Nested PCR" utilizando nuevos "primers" que hibridan en posiciones más internas de ambas regiones que los usados en la primera reacción.

Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el cDNA con los adaptadores como molde y se obtuvo amplificación del fragmento correspondiente al extremo 3´, el cual cuando se secuenció incluyó la cola de poli(A) indicando que se había alcanzado el extremo 3´ del mRNA. La amplificación del extremo 5´ sólo se logró cuando se utilizó un programa de temperaturas de la reacción de PCR denominado "Touchdown PCR" tanto en la primera reacción como en la reacción de "Nested PCR". La técnica de "Touchdown PCR" consiste en una serie de ciclos en los que la temperatura de apareamiento-extensión desciende gradualmente con el paso de los ciclos (72→68 C). Debido a que la T_m (Temperatura de fusión) del "primer" que se une al adaptador es menor que la de los "primers" específicos, durante los primeros ciclos sólo se une el "primer" específico lo que hace que ocurra una amplificación lineal usando sólo dicho "primer" produciendose así un enriquecimiento selectivo de la muestra en un fragmento conteniendo la región de interés. El fragmento correspondiente a la reacción de "Nested PCR" del extremo 5´ presentaba una seria de bandas difusas cercanas a la banda de interés al analizarlo en un gel de agarosa lo que impidió la secuenciación directa haciendo necesario su clonado. Debido a que los fragmentos de PCR poseen extremos romos y la ligación de este tipo de extremos es muy poco efectiva se realizó el clonado utilizando la técnica de "TA cloning" que se basa en la creación artificial de extremos cohesivos. Para ello, el vector de clonado posee extremos 3´ protruyentes con una T no apareada y en forma complementaria al fragmento de PCR se le agrega una A no apareada generándole consecuentemente extremos 5´ protruyentes que serán complementarios a los del vector. El vector ligado con el inserto se usó para transformar bacterias competentes del sistema azules-blancas. Se analizaron 6 clones azules (y 2 blancos como control); se extrajo el plásmido y se cortó con dos conjuntos de enzimas de restricción obteniéndose en todos los casos el patrón esperado de corte según se evidenció por electroforesis en geles de agarosa. Dos clones se utilizaron para secuenciar obteniéndose el extremo 5´ del cDNA el cuál incluyó el codón de iniciación de la traducción y 133 bp "río arriba" de éste. De esta forma se obtuvo la secuencia completa del cDNA de la 11β-HSD-2 bovina que enviada al GenBank con el número de acceso AF074706. Una vez obtenida la secuencia del cDNA de la 11β–HSD-2 bovina se construyó un plásmido de expresión eucariota con el fin de caracterizar el producto proteico codificado por este cDNA. El inserto del plásmido de expresión se obtuvo

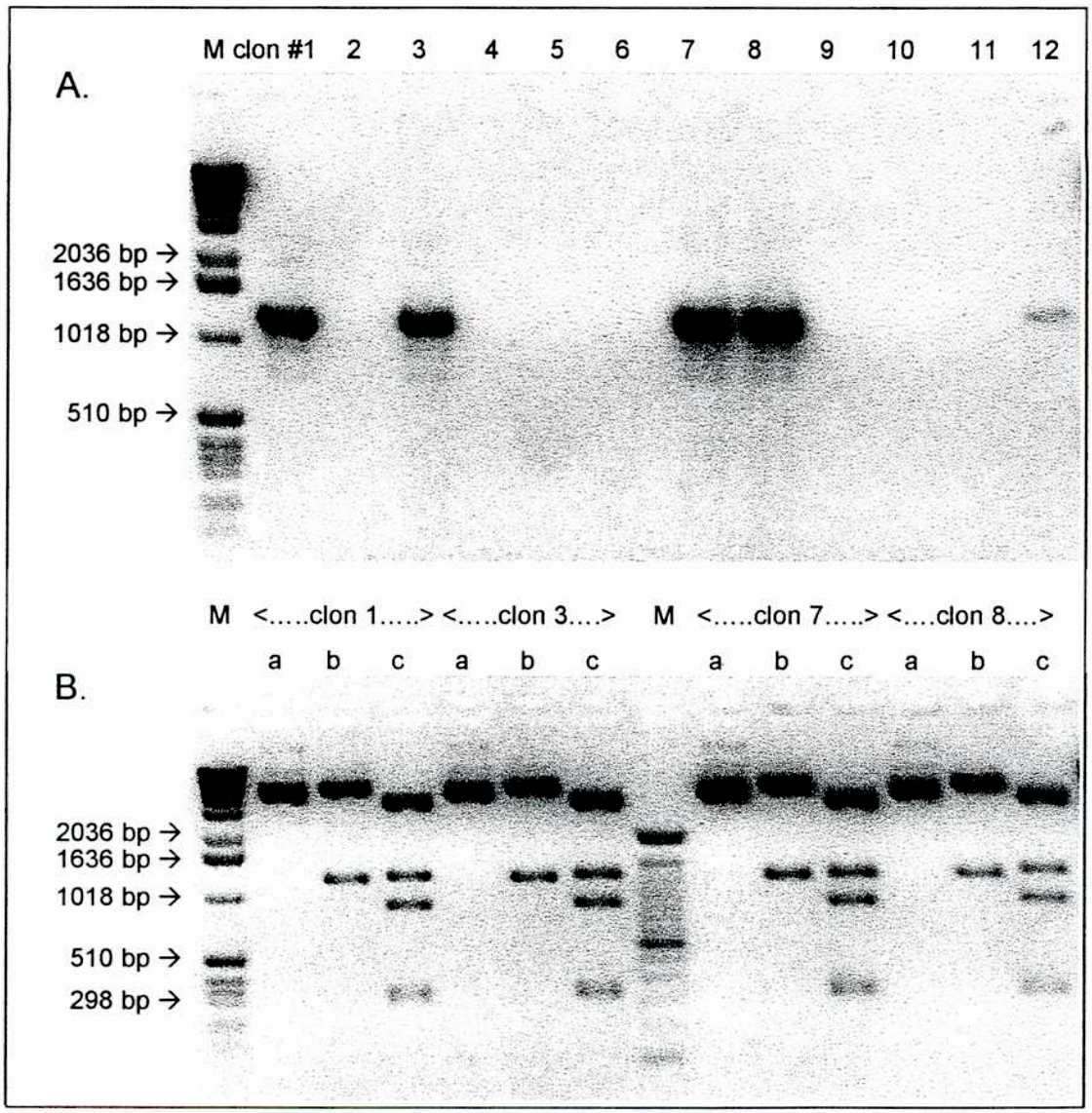


Fig. 3.5.4. Detección de plásmidos conteniendo el fragmento codificante de la 11β-HSD-2 bovina. Panel A: 10 colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido conteniendo la región codificante de la 11β-HSD-2 bovina se cultivaron en medio LB durante toda la noche. 0.1 ml de esos cultivos se incubaron 5 min a 100 C. 1 µl del sobrenadante de esta última incubación fue utilizado como molde para la reacción de PCR (primers S-5-b y A-4-b -que abarcan toda la región codificante-, condiciones de ciclado: un período inicial del min a 94 C; seguido de 25 ciclos de 30 seg a 94 C más 3 min a 68 C; y por último un período de extensión final de 7 min a 68C). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1.5 %. Calle 1: Marcadores de PM, calles 2-11: clones 1-10. Se observa el producto de PCR del tamaño esperado (1200 bp) en la calles correspondientes a los clones 1, 3, 7 y 8. Panel B: 2 µg de plásmido proveniente de los clones positivos en la reacción de PCR se digirieron parcialmente con dos conjuntos de enzimas de restricción XbaI/XhoI y XbaI/XhoI/HindIII. Para cada clon se analizó el plásmido sin digerir (a) y el plásmido digerido con XbaI/XhoI (b) y XbaI/XhoI/HindIII (c) como se detalla en la foto. Todos los clones presentaron fragmentos del tamaño esperado: aprox. 1200 bp para XbaI/XhoI y 1200, 900 y 300 bp para XbaI/XhoI/HindIII.

mediante amplificación por PCR de la región codificante completa utilizando "primers" flanqueantes de ésta que poseían sitios de corte de enzimas de restricción diferentes, y que no se hallaban en la región codificante, con el fin de realizar un clonado direccional. El plásmido conteniendo el inserto de la región codificante de la 11β–HSD-2 bovina se utilizó para transformar bacterias. Las bacterias transformadas con el control de ligación del plásmido -no conteniendo el inserto- presentó un número similar de colonias a las transformadas con el plásmido conteniendo el inserto. Este resultado inesperado, debido a que los extremos del plásmido cortado eran incompatibles, indicaba que probablemente la digestión no había sido completa tal vez debido a la cercanía de los sitios de corte. Esto llevaba a suponer que muchos de los clones obtenido con el plásmido quimera podían no contener el inserto. Para dilucidar esto, se tomaron 10 clones, se extrajo el plásmido y se analizó por PCR la presencia de la región codificante de 11β–HSD-2. Cuatro de los clones que poseían el inserto (Fig. 3.5.4-A) lo cual fue confirmado mediante mapeo por restricción utilizando dos conjuntos de enzimas de restricción (Fig. 3.5.4-B). Los clones 1 y 3 fueron utilizados para transfectar células CHOP y determinar la presencia de actividad de 11β–HSD-2 bovina en células enteras y en homogenatos.

Actividad de 11β-HSD-2 bovina en células transfectadas enteras

En la Fig. 3.5.5 se observa la determinación de la actividad 11β–HSD en células CHOP transfectadas utilizando [^{3}H]-cortisol o [^{3}H]-corticosterona como sustrato. Las células no transfectadas no presentan actividad detectable de 11β–HSD indicando la ausencia de expresión endógena de esta enzima. En las células tratadas con el agente de transfección (LipofecAMINE) o transfectadas con el plásmido sin el inserto no se observa actividad de 11β–HSD. Los clones 1 y 3 presentaron actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD tanto con cortisol como con corticosterona. La actividad con corticosterona fue 2.5-3.5 veces mayor que con cortisol para ambos clones. La actividad de 11β–HSD del clon 3 fue mayor que la del clon 1.

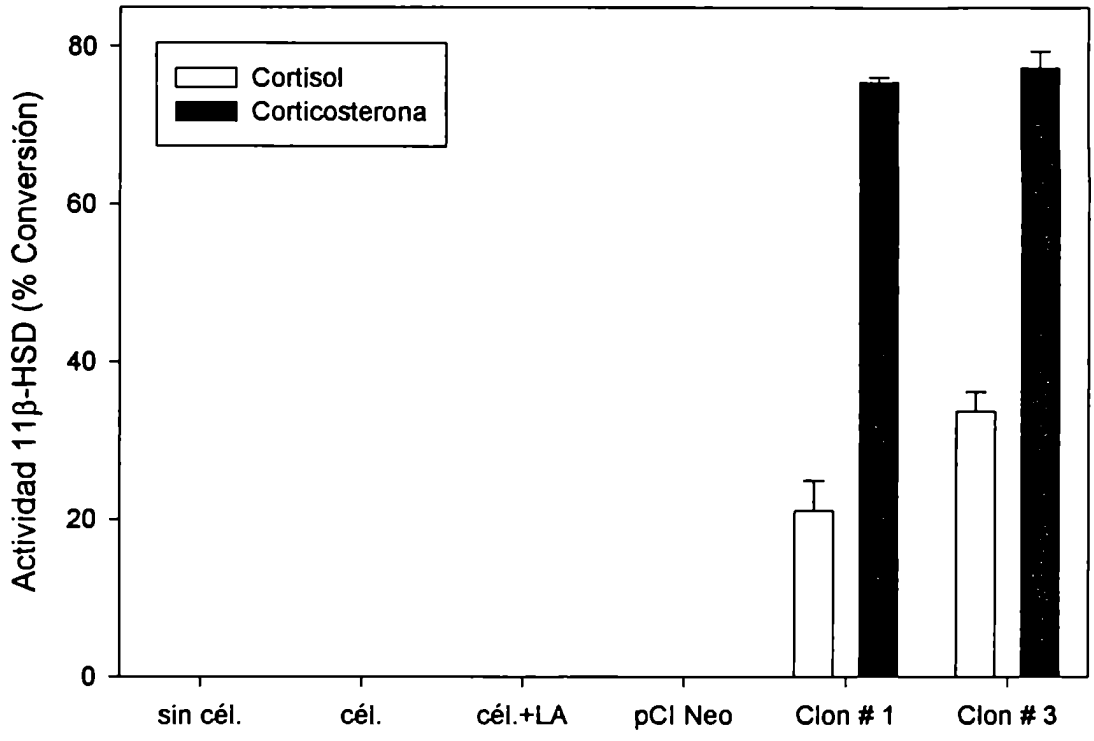


Fig. 3.5.5. Actividad de deshidrogenasa de 11β-HSD en células CHOP transfectadas con el cDNA de la 11β-HSD-2 bovina. Células CHOP controles (cél.), células CHOP transfectadas en ausencia de plásmido (cél.+LA) o células CHOP transfectadas con el plásmido sin el inserto (pCI Neo) o con dos clones de la región codificante del cDNA de la 11β-HSD-2 bovina (clon 1 y 3) fueron incubadas con [^{3}H]-cortisol (barras vacias) o [^{3}H]-corticosterona (barras llenas) durante 2 hs a 37 C. Posteriormente se extrajeron los esteroides del sobrenadante de incubación y la actividad de 11β-HSD-2 se determinó como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los resultados se expresan como el porcentaje de conversión de cortisol y corticosterona en sus derivados 11-oxidados. Los valores se presentan como medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Actividad de 11β-HSD-2 bovina en homogenatos de células transfectadas

Posteriormente se ensayó la actividad de 11β–HSD en homogenatos de células transfectadas. Para ello, se transfectaron células con ambos clones de 11β–HSD-2, se cultivaron durante 48 hs, se cosecharon y homogeneizaron. La actividad de 11β–HSD se determinó realizando una curva con concentraciones crecientes de proteína, [^{3}H]-cortisol y NAD^+ como cofactor. En la Fig. 3.5.6 se observa que ambos clones presentan actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD. Esta actividad se incrementa en forma proporcional a la concentración de proteína alcanzando valores de conversión cercanos al 100 % con 25 μg de proteína. La actividad del clon 3 es levemente mayor en todo el

rango de concentraciones proteicas ensayado. Estos resultados demuestran que el cDNA clonado codifica para una enzima con actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD en células enteras y homogenatos utilizando NAD^+ como cofactor. El clon 3 fue seleccionado para los experimentos posteriores por presentar mayor actividad enzimática.

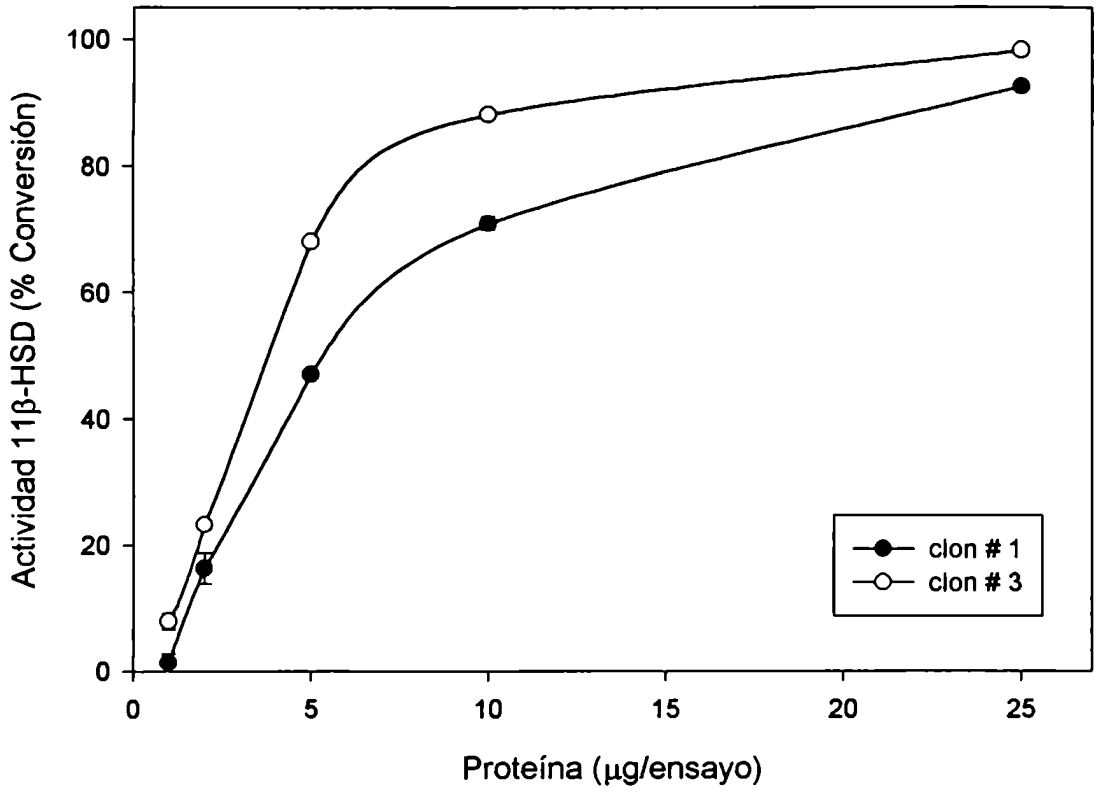


Fig. 3.5.6. Actividad de deshidrogenasa de 11β-HSD en homogenatos de células CHOP transfectadas con el cDNA de la 11β-HSD-2 bovina. Células CHOP transfectadas con el dos clones de la región codificante del cDNA de la 11β-HSD-2 bovina (clon 1 y 3) fueron cosechas y homogeneizadas. La actividad de 11β-HSD-2 se determinó utilizando [^{3}H]-cortisol, NAD^+ y concentraciones crecientes de proteína. La actividad de 11β-HSD-2 se determinó como se detalla en *Materiales y Métodos* y se expresa como el porcentaje de conversión de cortisol en cortisona. Los valores se presentan como medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Características del cDNA

El cDNA de la 11β–HSD-2 bovina consta de 1878 bp sin incluir la cola de poli A (Fig. 3.5.7). Consiste de una región 5´ no codificante de 133 bp, un marco de lectura abierto de 1215 bp y una región 3´no codificante de 530 bp. El cDNA posee un alto contenido de G+C (60.9 %). Esto se observa especialmente en el extremo 5´ donde en las primeras 400 bp presentan un porcentaje de G+C que alcanza valores de 72.8 %. En esta zona se halla una alta densidad de las llamadas "islas CpG" [565,566] con 3 ocurrencias entre las bases 105 y 472. El contenido de G+C y CpG decrece abruptamente luego de las primeras 500 bases del cDNA. El codón de iniciación ATG se halla en un contexto óptimo para la iniciación de la traducción (GCCGCCATGG) ya que guarda absoluta similitud con la secuencia consenso (GCC(A/G)CCATGG) del sitio de unión del ribosoma definida por Kozak M. [567]. El cDNA de la 11β–HSD-2 bovina es altamente homólogo al de la oveja (92 %) y menos relacionado al humano (67 %), conejo (65 %), rata (52 %) y ratón (45 %) (Fig. 3.5.8). La secuencia predicha para la proteína codificada por el cDNA de la 11β–HSD-2 bovina está compuesta por un polipeptido de 404 aminoácidos con un PM calculado de 43.985, y que es altamente homólogo a la secuencia de la oveja (98 %), humana (88 %), y menos relacionadas con las de conejo (76 %), rata (80 %) y ratón (77 %) (Fig. 3.5.9). En la Fig. 3.5.10 se observa el perfil de hidrofobicidad de la secuencia proteica predicha según el método de Kyte J. y Doolittle R.F. [413]. La secuencia proteica posee dos potenciales sitios de glicosilación en los residuos (96-98) y (245-247).

Caracterización de la 11β–HSD-2 bovina: Células enteras

A continuación se caracterizó la actividad de la 11β–HSD-2 bovina en células transfectadas enteras. Se determinó la actividad de deshidrogenasa y reductasa incubando células CHOP transfectadas con [^{3}H]-cortisol, [^{3}H]-corticosterona o [^{3}H]-dexametasona y sus respectivos derivados 11-oxidados (Fig. 3.5.11). A partir de

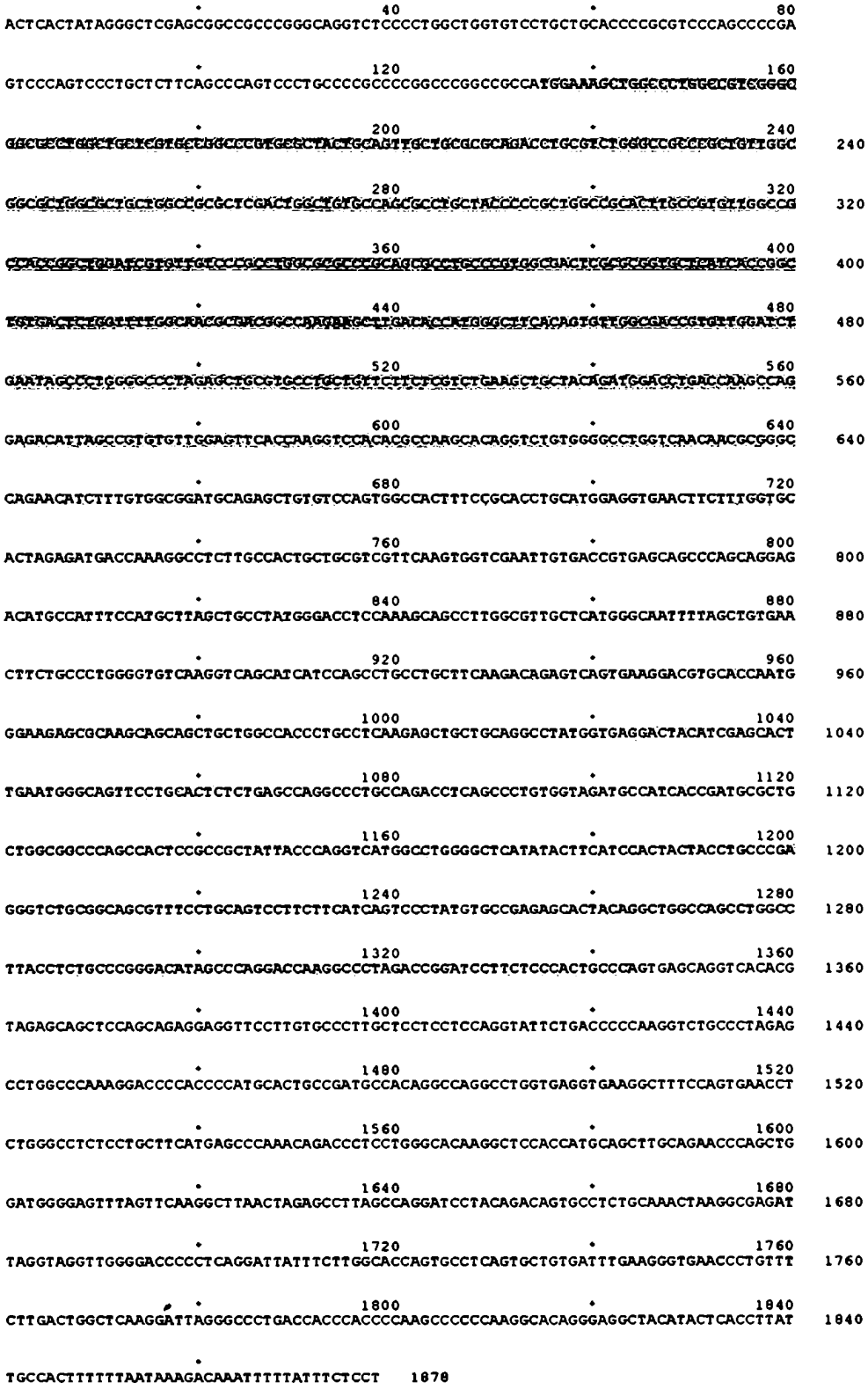


Fig. 3.5.7. Secuencia cDNA de la 11β-HSD-2 bovina. La zona sombreada corresponde a la región codificante.

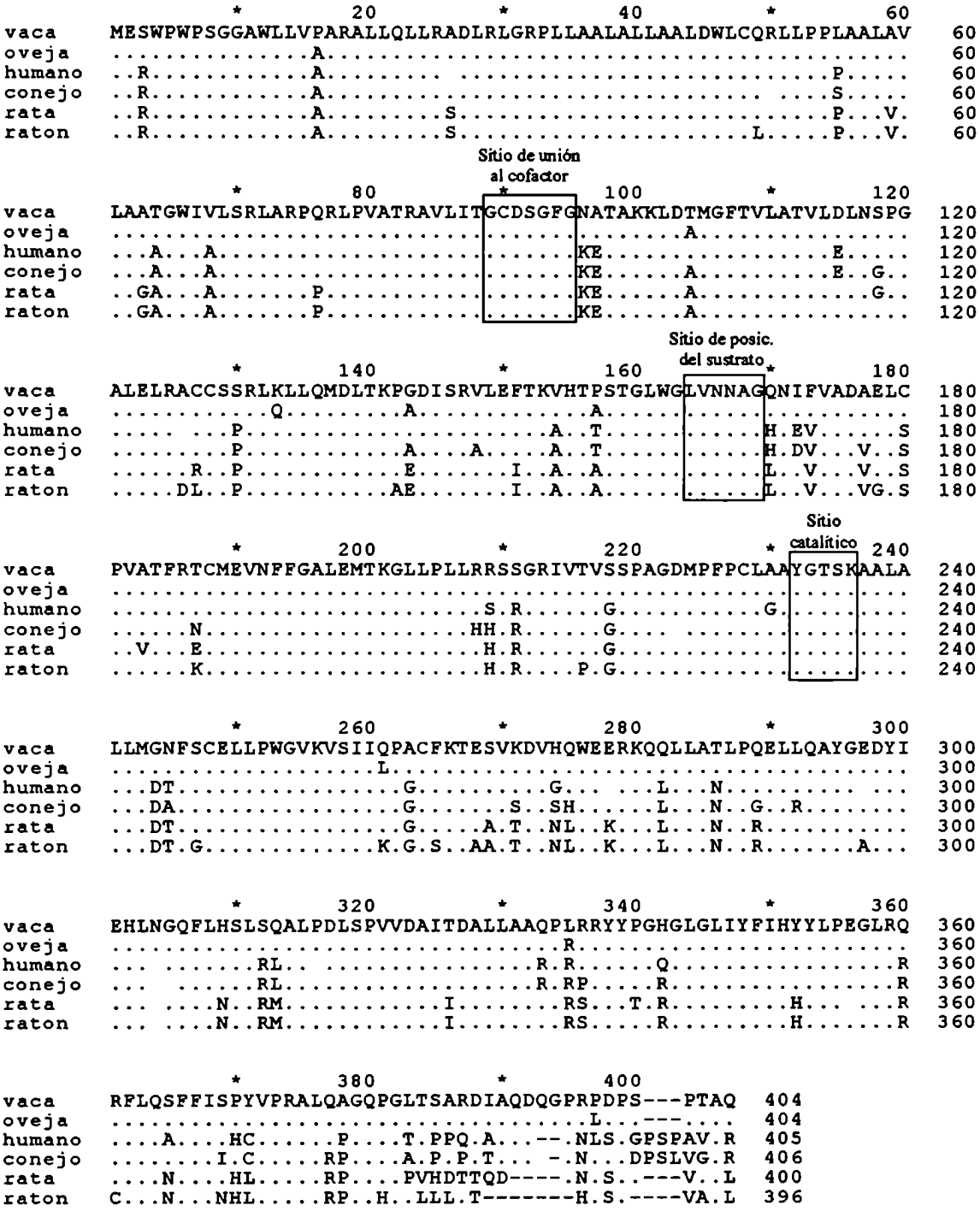
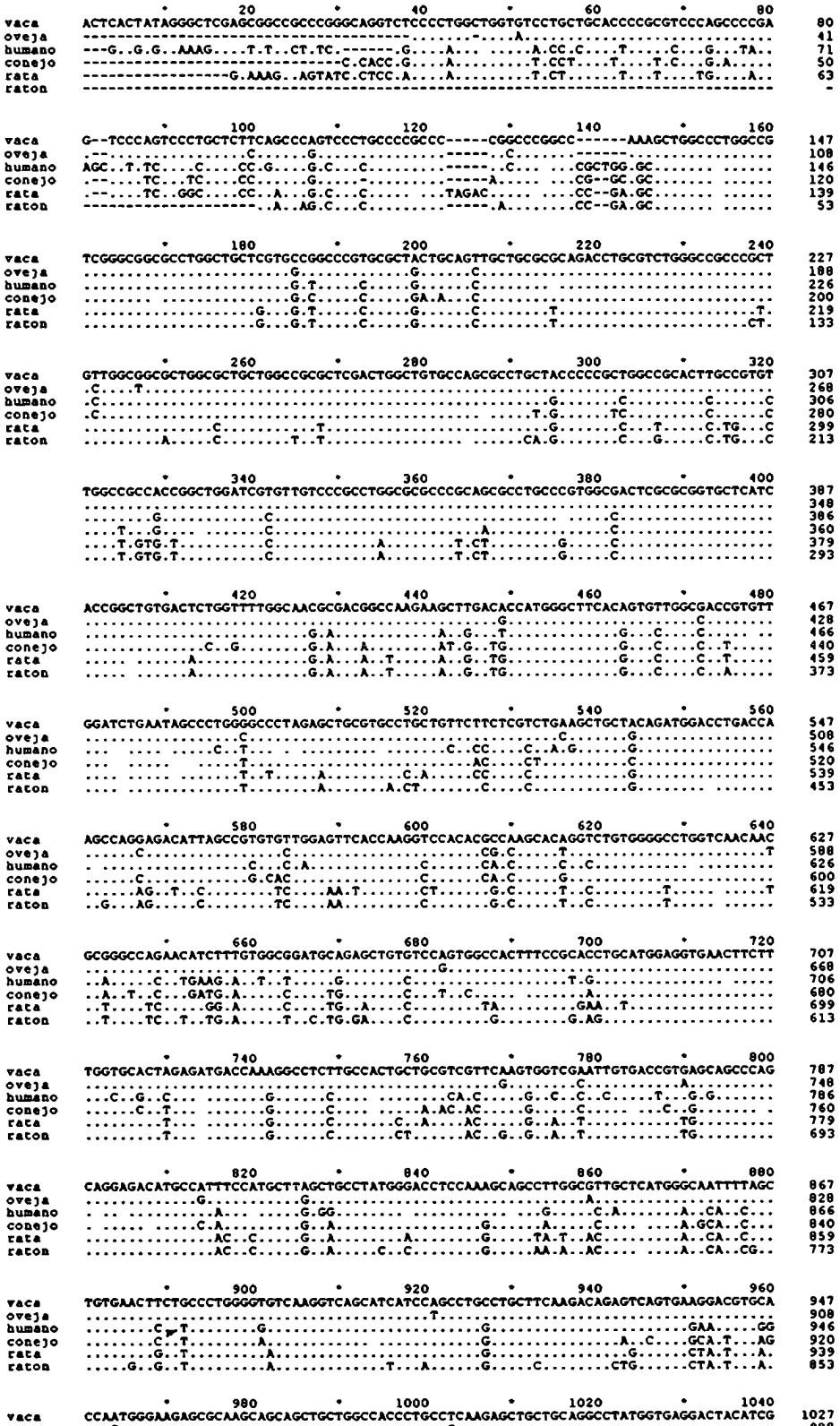


Fig. 3.5.9. Comparacion secuencias proteicas predichas de la 11β-HSD-2 bovina con otras especies.



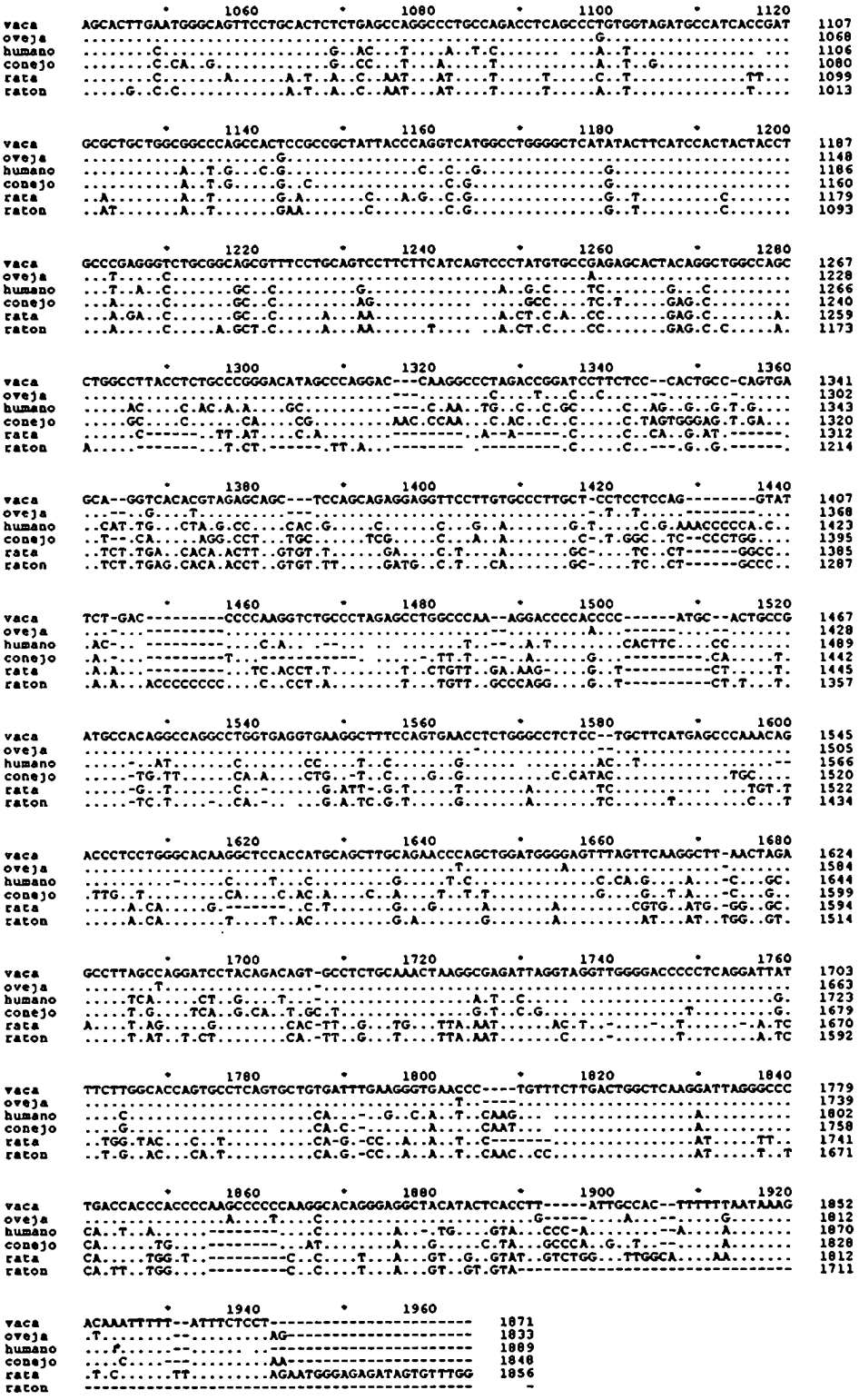


Fig. 3.5.8. Comparación de las secuencias de los cDNAs de la 11β-HSD-2 de distintas especies.

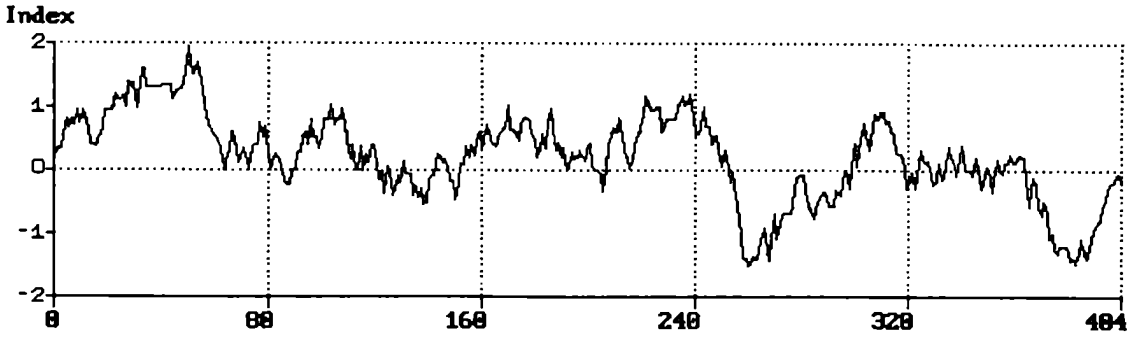


Fig. 3.5.10. Perfil de hidrofobicidad de la secuencia proteica predicha de la 11β-HSD-2 bovina. El análisis de hidrofobicidad se realizo según el método de Kyte J. y Doolittle R.F. {1320} con una ventana de 20 aminoácidos mediante el programa Prosis (v 7.00).

similares concentraciones de sustratos, la 11β–HSD-2 bovina presentó un porcentaje de conversión de sustrato en producto del 36.5 % para cortisol, 92.5 % para corticosterona y 29.9 % para dexametasona en sus respectivos derivados 11-oxidados luego de 2 hs de incubación. No se observó conversión de cortisona u 11-dehidrocorticosterona en sus respectivos derivados 11-reducidos. Sólo 11-dehidrodexametasona sufrió una ligera conversión (5.6 %) en dexametasona. de esta forma, la 11β–HSD-2 bovina expresada en células CHOP se comporta esencialmente como una deshidrogenasa.

Las constantes cinéticas para los sustratos esteroideos determinadas en células enteras se muestran en la Tabla 3.5.1.

Tabla 3.5.1: Parámetros cinéticos de la 11β–HSD-2 bovina en células enteras.

Sustrato	K_m (nM)	$V_{máx}$ (pmol/10^5cel.h)
Cortisol	322.6	24.2
Corticosterona	141.4	104.8
Dexametasona	226.9	17.8

2.5×10^4 Células CHOP transfectadas con la 11β–HSD-2 bovina se incubaron con concentraciones crecientes (2-120 nM) de los esteroides tritiados (sustratos) en 1 ml de medio HAM F-10 durante 2 hs a 37 C. Luego, se extrajeron los esteroides, separaron y cuantificaron como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los parámetros cinéticos fueron ajustados a la hipérbola mediante regresión no lineal.

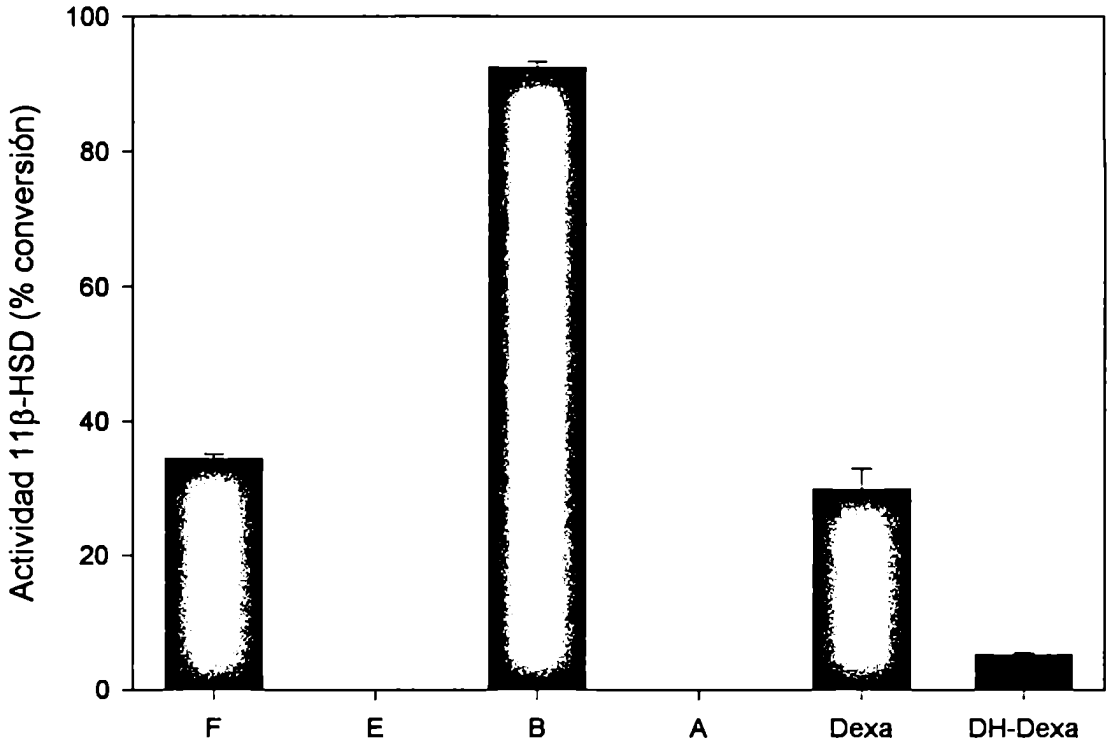


Fig. 3.5.11. Direccionalidad de la reacción de la 11β-HSD-2 bovina en células CHOP transfectadas. Células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina fueron incubadas con 200.000 dpm (5-10 nM) de [^{3}H]-cortisol (F), [^{3}H]-cortisona (E), [^{3}H]-corticosterona (B), [^{3}H]-11-dehidrocorticosterona (A), [^{3}H]-dexametasona (Dexa), [^{3}H]-11-dehidrodexametasona (DH-Dexa) durante 2 hs a 37 C. Posteriormente se extrajeron los esteroides del medio de incubación y se analizaron como se detalla en *Materiales y Métodos*. La actividad de 11β-HSD-2 se expresa como el porcentaje de conversión de sustrato en producto. Los valores se presentan como media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Además, se ensayaron diversos compuestos como inhibidores de la actividad de 11β–HSD-2 en células transfectadas utilizando cortisol como sustrato (Fig. 3.5.12). Los inhibidores más potentes fueron carbenexolona, ácido glicirretínico y 11αOH-progesterona con IC_{50} de 4.88 ± 0.63, 21.50 ± 3.12 y 33.98 ± 3.57 nM respectivamente. 11βOH-Progesterona fue más de 10 veces menos potente como inhibidor que 11αOH-progesterona con un IC_{50} de 448.7 ± 66.01 nM.

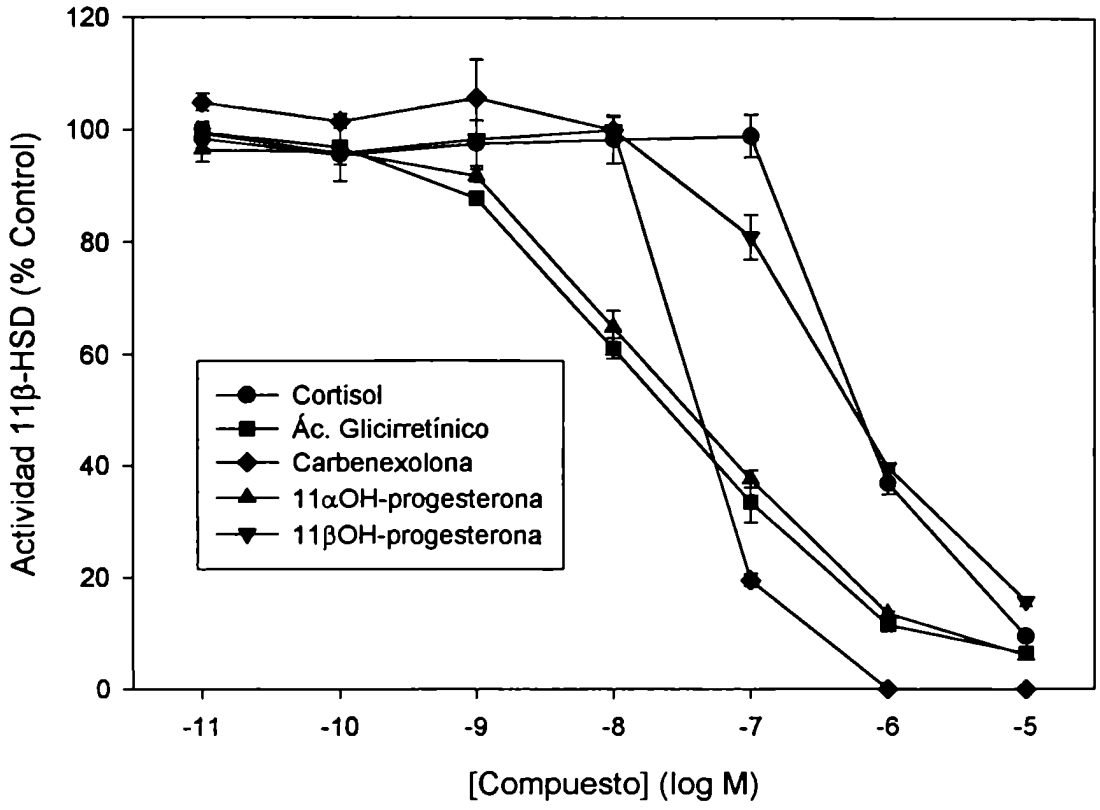


Fig. 3.5.12. Efecto de distintos compuestos sobre la actividad de 11β-HSD-2 bovina en células transfectadas. Células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina fueron incubadas con 200.000 dpm (5-10 nM) de [^{3}H]-cortisol y concentraciones crecientes de los distintos compuestos ensayados durante 2 hs a 37 C. Posteriormente se extrajeron los esteroides del medio de incubación y se analizaron como se detalla en *Materiales y Métodos*. La actividad de 11β-HSD-2 se expresa como el porcentaje respecto del control sin agregado de compuestos inhibitorios. Los valores se presentan como medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Caracterización de la 11β–HSD-2 bovina: Homogenatos

Con el fin de estudiar la dependencia de cofactores de la 11β-HSD-2 bovina clonada, se incubaron homogenatos de células transfectadas con NAD^+ o $NADP^+$ como cofactores y con cortisol, corticosterona o dexametasona como sustratos (Fig. 3.5.13). Cinco y 20 µg de proteína convirtieron 16.4 % y 69.5 % de cortisol en cortisona luego de 15 min de incubación con NAD^+ mientras que $NADP^+$ no resultó efectivo como cofactor.

Por otro lado, utilizando cinco microgramos de proteína corticosterona fue transformada en 11-dehidrocorticosterona en un 84.1 % y dexametasona en 11-dehidrodexametasona en un 30.1 %, siempre con NAD^+ como cofactor. En cambio, en presencia de $NADP^+$

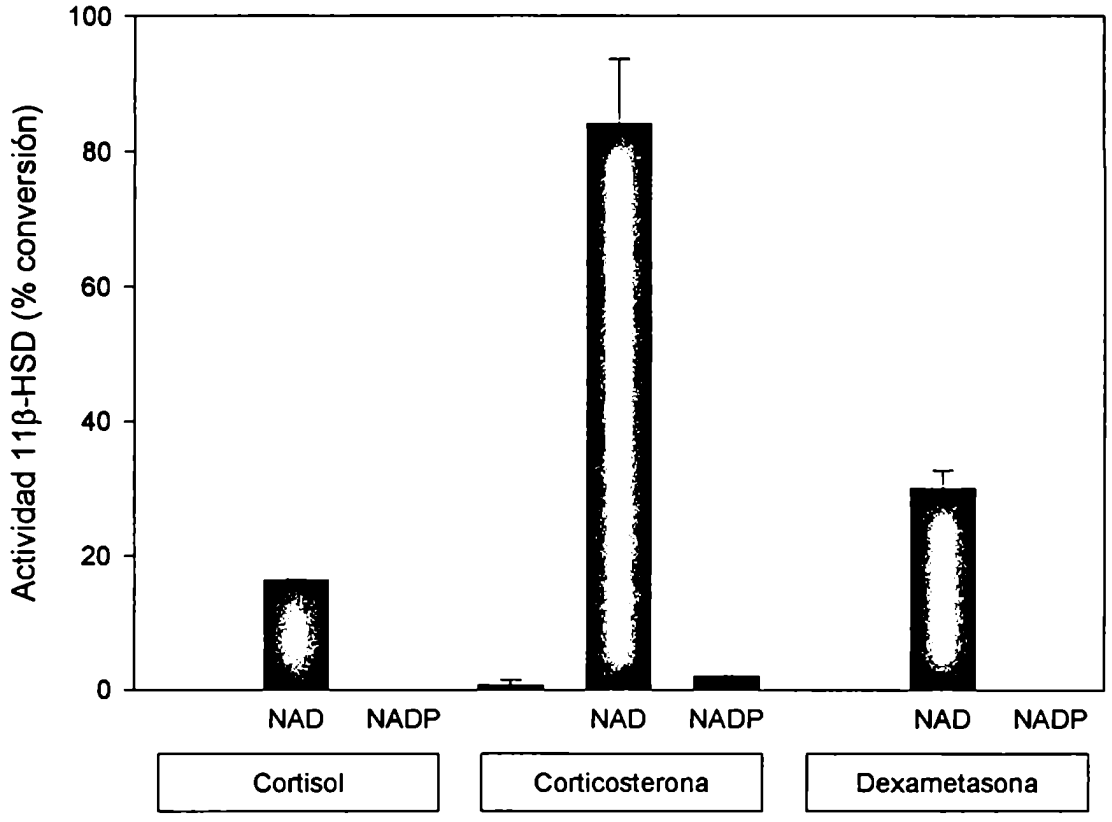


Fig. 3.5.13. Dependencia de cofactores de la 11β-HSD-2 bovina en homogenatos de células CHOP transfectadas. Homogentatos de células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina fueron incubados con [^{3}H]-cortisol y NAD^+ o $NADP^+$ 0.5 mM durante 15 a 37C y posteriormente la actividad de 11β-HSD-2 determinó como se detalla en *Materiales y Métodos*, la cuál se expresa como el porcentaje de conversión de cortisol en cortisona. Los valores se presentan como media ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

sólo corticosterona fue ligeramente oxidada a 11-dehidrocorticosterona, obteniéndose un 2.0 % de conversión con $NADP^+$ respecto de 0.7 % sin el agregado de cofactor. Así todos estos resultados evidencian una dependencia de NAD^+ para la reacción de deshidrogenasa.

La capacidad relativa de la 11β–HSD-2 bovina de catalizar la reacción inversa (reducción) fue estudiada en homogenatos con cortisol, corticosterona o dexametasona y sus respectivos derivados 11-oxidados como sustratos. Teniendo en cuenta los resultados anteriores que confirmaban la presencia de una 11β-HSD de tipo 2, se utilizó NAD^+ como cofactor para determinar la actividad de deshidrogenasa y NADH para la de reductasa. Ocho microgramos de proteína de homogenatos de células transfectadas con la 11β–HSD-2 bovina convirtieron 33.2 % de cortisol en cortisona, 66.9 % de

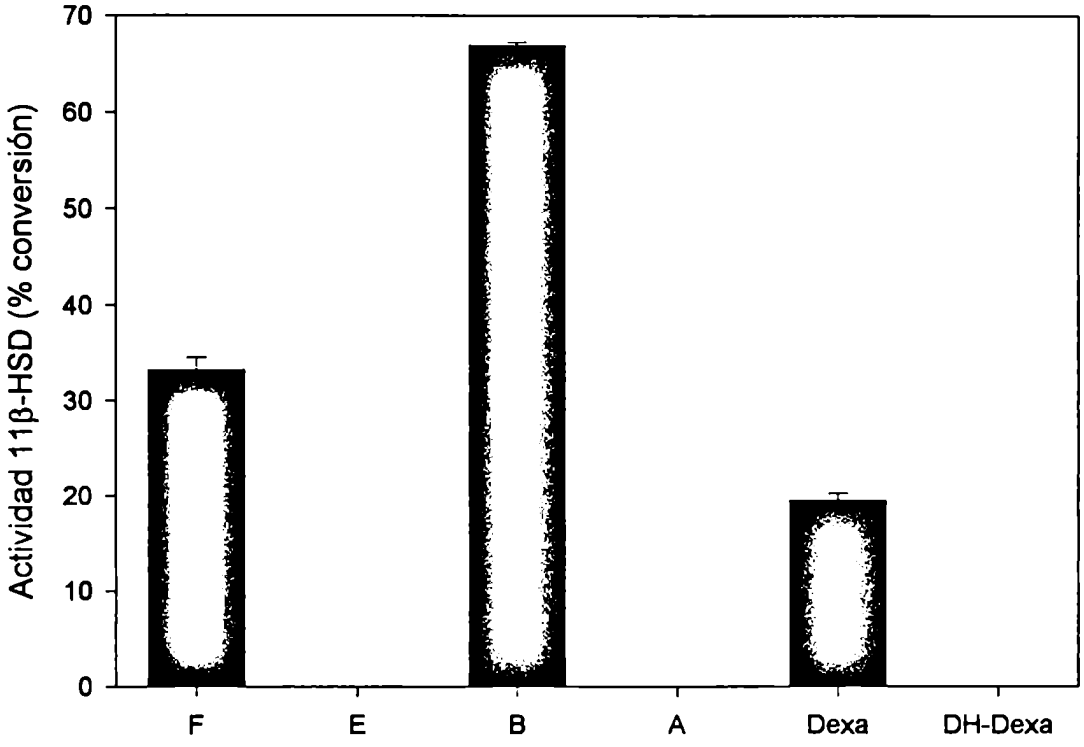


Fig. 3.5.14. Direccionalidad de la reacción de la 11β-HSD-2 bovina en homogenatos de células CHOP transfectadas. 5 μg de proteína de homogenatos de células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina fueron incubados con 200.000 dpm (5-10 nM) de [^{3}H]-cortisol (F), [^{3}H]-cortisona (E), [^{3}H]-corticosterona (B), [^{3}H]11-dehidrocorticosterona (A), [^{3}H]dexametasona (Dexa), [^{3}H]-11-dehidrodexametasona (DH-Dexa) y NAD^+ 0.5 mM durante 15 a 37 C y posteriormente la actividad de 11β-HSD-2 determinó como se detalla en *Materiales y Métodos*, la cuál se expresa como el porcentaje de conversión de cortisol en cortisona. Los valores se presentan como medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

corticosterona en 11-dehidrocorticosterona y 19.5 % de dexametasona en 11-dehidrodexametasona (Fig. 3.5.14). No hubo conversión detectable de cortisona, 11-dehidrocorticosterona u 11-dehidrodexametasona en sus respectivos derivados 11-reducidos.

En la tabla 3.5.2 se observan los parámetros cinéticos determinados para los sustratos esteroideos reducidos de la 11β–HSD-2 bovina en homogenatos de células transfectadas.

Tabla 3.5.2: Parámetros cinéticos de la 11β–HSD-2 bovina en homogenatos de células transfectadas.

Sustrato	K_m (nM)	$V_{máx}$ (nmol/mg prot.h)
Cortisol	45.6	1.89
Corticosterona	5.5	6.38
Dexametasona	71.8	2.16

0.5 µg de proteína total de homogenatos de células CHOP transfectadas con la 11β–HSD-2 bovina se incubaron con concentraciones crecientes (2-120 nM) de los esteroides tritiados en un volumen final de 0.5 ml durante 15 min a 37. Luego, se extrajeron los esteroides, separaron y cuantificaron como se detalla en *Materiales y Métodos*. Los parámetros cinéticos fueron ajustados a la hipérbola mediante regresión no lineal.

Por último, se realizaron estudios de inhibición de la actividad de 11β–HSD-2 con diversos compuestos utilizando cortisol como sustrato (Fig. 3.5.15). Los más potentes inhibidores fueron 11βOH-progesterona y 11αOH-progesterona con IC_{50} de 1.71 ± 0.65, 2.41 ± 0.52 nM respectivamente seguidos de ácido glicirretínico y carbenexolona con IC_{50} de 67.4 ± 9.3 and 96.2 ± 28.7 nM respectivamente.

Distribución tisular

Se estudió la distribución tisular de la 11β–HSD-2 bovina mediante RT-PCR. Para ello, se extrajo el RNA total de distintos tejidos conservados en N_2 líquido por no más de 24 hs, a partir de los cuales se obtuvo la hebra complementaria con transcriptasa reversa y posteriormente se utilizó dos conjuntos de "primers" para la reacción de PCR. Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa como se muestra en la Fig. 3.5.16. El mRNA de la 11β–HSD-2 bovina se expresa en altas concentraciones en riñón, colon y adrenal; en pulmón e hígado el nivel de expresión es menor y en corazón es indetectable (Fig. 3.5.17).

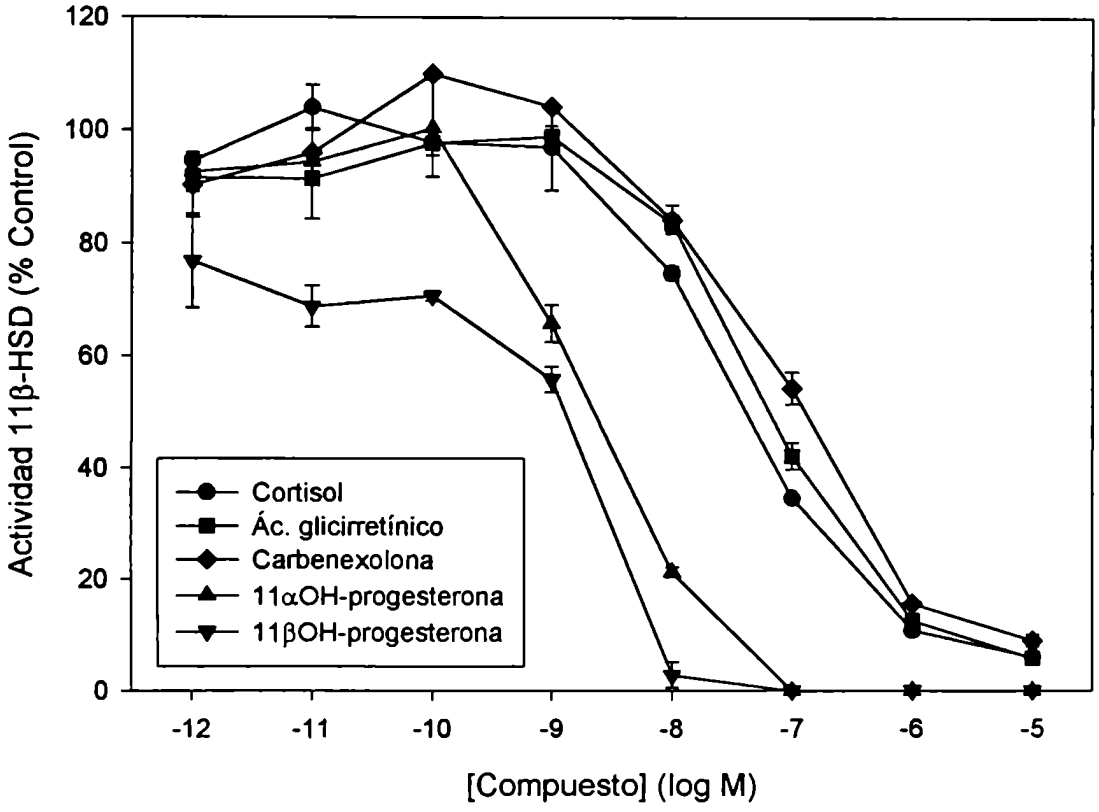


Fig. 3.5.15. Efecto de distintos compuestos sobre la actividad de 11β-HSD-2 bovina en homogenatos de células transfectadas. 8 μg de proteína de homogenatos de células CHOP transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina fueron incubadas con 200.000 dpm (5-10 nM) de [^{3}H]-cortisol (F) y concentraciones crecientes de los distintos compuestos ensayados durante 15 min a 37 C. Posteriormente los esteroides se analizaron como se detalla en *Materiales y Métodos*. La actividad de 11β-HSD-2 se expresa como el porcentaje respecto del control sin agregado de compuestos inhibitorios. Los valores se presentan como medias ± ES de dos experimentos realizados por duplicado.

Discusión

La glándula adrenal bovina presentó actividad de ambas isoformas de 11β–HSD (Fig. 3.5.1). La actividad de deshidrogenasa de 11β–HSD-2 fue aproximadamente el doble de la de 11β–HSD-1 en ambas capas adrenales. La segunda capa adrenal (enriquecida en la zona fasciculata) presentó una actividad aprox. 4.5 veces mayor que la primer capa (enriquecida en la zona glomerulosa) de ambas isoformas de 11β–HSD.

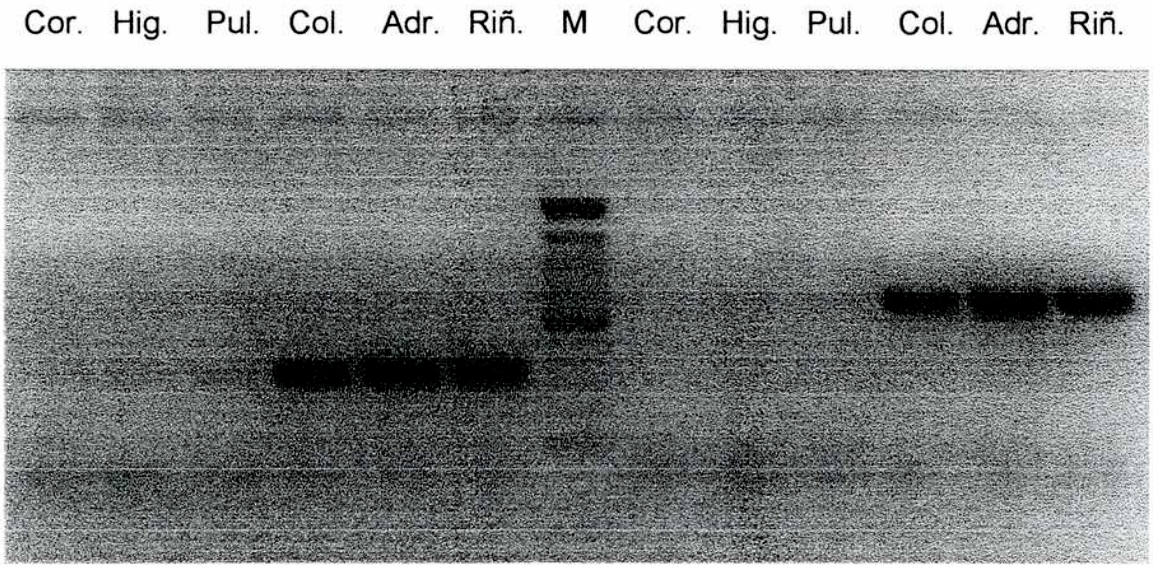


Fig. 3.5.16. Distribución tisular de 11HSD-2 bovina. Se extrajo RNA total de corazón (Cor.), hígado (Hig.), pulmón (Pul.), colon (Col.), adrenal (Adr.) y riñón (Riñ.) bovino y se analizó mediante RT-PCR como se detalla en *Materiales y Métodos*.

Al analizar la especificidad de sustrato, se observó que la 11β–HSD de microsomas adrenales de vaca presenta actividad de deshidrogenasa para ambas isoformas utilizando corticosterona como sustrato. Sin embargo, no se detectó actividad cuando se utilizó cortisol como sustrato. La ausencia de metabolización de cortisol por la 11β–HSD-2 difiere de los resultados observados por otros autores. Li K.X. *et al.* [503] observaron conversión de cortisol en cortisona con la 11β–HSD-2 de rata expresada en células CHOP tanto en células enteras como en homogenatos de éstas utilizando NAD^+ como cofactor. Una posible explicación sería que existiesen diferencias entre la 11β–HSD-2 nativa y la expresada en células transfectadas. Aunque esto no puede ser descartado, existe el inconveniente de que si la 11β-HSD-2 no metaboliza a cortisol entonces, este esteroide cuando es administrado podría actuar en la rata como un potente mineralocorticoide ya que no sería excluido de los receptores de mineralocorticoides en el riñón por la 11β–HSD-2 y ése no es el caso (actividad mineralocorticoide respecto de corticosterona (1): cortisol: 0.2, aldosterona: 400 [568]). Otra posible explicación consistiría en que al co-existir en la fracción microsomal ambas isoformas de 11β–HSD, la cortisona formada por la 11β–HSD-2 fuese utilizada como sustrato de la actividad de

reductasa de la 11β–HSD-1 haciendo que no se acumule el producto de la primera reacción.

Estudios de inhibición con corticosterona, cortisol y sus derivados 11-oxidados utilizando [^{3}H]-corticosterona como sustrato mostraron una sensibilidad mayor para la 11β–HSD-2 bovina sobre la de rata. La corticosterona fue aprox. 20 veces más potente inhibidor en ambas especies indicando la preferencia de corticosterona sobre cortisol en los dos casos, a pesar de ser cortisol el principal glucocorticoide en los bovinos. Los derivados 11-oxidados presentaron menor potencia inhibitoria observándose el mismo orden de IC_{50} en ambas especies animales estudiadas siendo 11-dehidrocorticosterona más potente que cortisona. La inhibición por bajas concentraciones de cortisol (IC_{50}= 0.280 μM) de la 11β–HSD-2 de rata podría indicar que cortisol es sustrato y como se mencionó anteriormente en el experimento precedente no se observó conversión por la utilización por otras enzimas del producto formado.

El marcado por fotoafinidad de la fracción microsomal presentó una única banda de PM 36 kDa que fue dependiente del agregado de NAD^+ como cofactor. Esta banda no se observó en presencia de un exceso de sustrato radioinerte o del inhibidor específico de la 11β–HSD, la carbenexolona. Esta novedosa técnica de marcado difiere de otras ensayadas anteriormente en otros sistemas en las que se utiliza el sustrato fisiológico de la enzima y que puede ser realizada con fracciones crudas sin necesidad de purificar la enzima. Brown R.W. *et al.* [229] utilizaron esta técnica en homogenatos y distintas fracciones de placenta humana para marcar la 11β–HSD-2. Observaron una única banda en geles bidimensionales lo que demuestra la especifidad de la reacción.

El marcado fue dependiente de NAD^+ y presentó una preferencia de sustratos similar a la obtenida en ensayos de actividad enzimática: corticosterona > cortisol > dexametasona; aldosterona no presentó reactividad. Dado que sólo ocurre una marcación por molécula proteica, la actividad específica de las proteínas marcadas es muy baja. En los experimentos presentados sólo se observaron bandas de muy baja intensidad después de 35 días de exposición a la película autoradiográfica. No se observaron bandas con microsomas de adrenal de rata posiblemente porque la actividad específica de la 11β–HSD-2 de rata es 4 veces menor que la de vaca, lo que reduce la sensibilidad dado

que por otro lado existe un límite máximo de carga de proteínas en los geles utilizados en la electroforesis.

La marcación de la 11β–HSD-2 probablemente ocurra en el sitio activo ya que requiere la presencia de cofactor y es inhibida por carbenexolona.

La 11β–HSD-2 humana expresada *in vitro* presentó un PM de aprox. 40 kDa [499]. Sin embargo cuando la transcripción-traducción se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de microsomas de páncreas canino se observó la aparición de una banda de un PM de 30 kDa. Por otro lado, al analizar por Western-blot distintos tejidos se observó que un anticuerpo específico contra 11β–HSD-2 de rata revelaba bandas de PM de 78, 40 y 30 kDa; llamativamente la banda de 30 kDa se observaba en tejidos con bandas intensas de 40 kDa lo cual podría indicar degradación o procesamiento post-traduccional.

La 11β–HSD-2 bovina tiene un PM estimado de 44 kDa similar al de otras especies. Sin embargo, en el marcado por fotoafinidad se observó una banda de PM aprox. 36 kDa. Esto podría indicar la ocurrencia de procesamientos post-traduccionales por clivaje que produjesen un péptido de menor PM al estimado por la región codificante del cDNA.

El clonado de la 11β–HSD-2 bovina se realizó mediante una combinación de las técnicas de PCR y RACE. El cDNA obtenido presenta un alto contenido en G+C principalmente en su extremo 5´ donde también se observa una alta densidad de las llamadas "islas CpG".

El dímero CpG se presenta en el genoma de los vertebrados en una frecuencia del 20 % de la esperada si fuese al azar [565,566]. En ciertas regiones del genoma, sin embargo, la densidad de dobletes CpG se incrementa en más de 10 veces con respecto al resto del genoma. Estas regiones ricas en "islas CpG" poseen un contenido de G+C de aprox el 60 % comparado contra el 40 % del genoma total. En general, las "islas CpG" no están metiladas lo cual sería indicativo de regiones con capacidad de ser transcriptas. Los nucleosomas de estas islas poseen un nivel reducido de histona H1 (indicando probablemente un empaquetamiento relajado), las otras histonas están intensamente acetiladas (en general asociado con genes con activa expresión) y existen sitios hipersensibles (indicativo de promotores activos). Las "islas CpG" comienzan "río

arriba" del promotor y se extienden en la región transcripta (generalmente el primer exón). Pueden hallarse tanto en genes ubicuos con expresión constitutiva como en genes con expresión tejido-específica. La metilación de las regiones con "islas CpG" generalmente previene la expresión génica mientras que las regiones no metiladas son indicativas de genes con capacidad de ser expresados [565,566]. Por lo tanto, el alto contenido de "islas CpG" en la 11β–HSD-2 bovina sería indicativo de un gen con alta capacidad de regulación de su expresión.

El codón de iniciación de la traducción (ATG) se halla enmarcado en la secuencia consenso hallada en la mayoría de los mRNA eucariotas por Kozak M. mediante comparación de secuencias [567] y mutaciones [569]. Veinte bases "río arriba" de la cola de poli(A) se observa la presencia de la secuencia consenso de poliadenilación (AATAAA).

El análisis de la secuencia aminoacídica deducida muestra que la 11β–HSD-2 pertenece a la familia de proteínas de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta ("short chain dehydrogenase/reductase", SDR). Los miembros de esta familia en general presentan una homología menor al 25 % pero sin embargo presentan un plegamiento similar. Parte del plegamiento proteico incluye un arreglo de α-hélices y hojas β-plegadas $(\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta)_2$ que genera un plegamiento tipo Rossmann de unión al cofactor [189,511,570]. El sitio de unión al cofactor se encuentra en la región N-terminal del péptido y contiene el motivo G-XXX-G-X-G que en la 11β-HSD-2 bovina está representado por la secuencia GCDSGFG (residuos 89-95). Un segundo motivo de posicionamiento del sustrato observado en alineamientos de miembros de la familia SDR [571] de la forma [LFVM] [VI] [NL] [N] [AVH(F)] [GI] se halla presente en la 11β–HSD-2 bovina (LVNNAG, residuos 164-169). Otro sitio conservado en las hidroxiesteroide deshidrogenasas pertenecientes a la familia SDR es el motivo Y-XXX-K donde los residuos tirosina (Y) y lisina (K) estarían involucrados en la catálisis [189,190,511,572] (YGTSK, residuos 232-236) ya que se hallan en estrecho contacto con el sustrato esteroideo en el bolsillo catalítico como se ha observado en los estudios de cristalografía de rayos X de la 3α,20β-HSD [573]. Los sitios catalítico y de unión al cofactor están altamente conservados y definen a los miembros de esta familia de proteínas [189,190,511].

El análisis del perfil de hidrofobicidad según el método de Kyte y Doolittle [413] reveló la existencia de tres regiones hidrofóbicas en la región N-terminal (Fig. 3.5.10) cada una constituida por aprox. 20 aminoácidos lo que podría indicar posibles segmentos transmembrana. Estudios realizados con células permeabilizadas con shock hipotónico indican que por lo menos la mitad C-terminal de la 11β–HSD-2 se halla del lado citoplasmático del retículo endoplasmático ya que es accesible por anticuerpos y esta reacción se anula con el pretratamiento con tripsina [237]. Por otro lado, la deglicosilación *in vitro* no modifica el PM de la 11β–HSD-2 [237] y el tratamiento con tunicamicina de células transfectadas no afecta la actividad enzimática [242]. Esto estaría de acuerdo con que los sitios de glicosilación se hallan hacia la región C-terminal de las posibles regiones transmembrana por lo que si esta región se halla del lado citoplasmático no podría alcanzar el lumen del retículo endoplasmático donde ocurre la glicosilación, o que si la glicosilasión existiese no sería imprescindible para la actividad.

La 11β–HSD-2 bovina expresada en células CHOP presentó, cuando se determinó su actividad en células enteras, el siguiente orden de transformación de los sustratos 11-reducidos: corticosterona > cortisol > dexametasona. La 11β–HSD-2 se comportó exclusivamente como una deshidrogenasa para corticosterona y cortisol, no observándose conversión de 11-dehidrocorticosterona y cortisona al cabo de dos horas de incubación. Sólo 11-dehidrodexametasona sufrió una metabolización en dexametasona del 5.6 %, correspondiente a un 19 % de la actividad observada con dexametasona como sustrato.

El orden de reactividad de los sustratos esteroideos observado con la 11β–HSD-2 bovina es similar al hallado en otras especies como fue informado para homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 de rata o humano [230,501,503,574], el cDNA de la 11β–HSD-2 de oveja expresado en ovocitos de *Xenopus* [231,575], la enzima purificada de placenta humana [229,499] o microsomas de riñón humano [500]. Aún se desconoce por qué la 11β–HSD-2 bovina al igual que la de humano y oveja presentan mayor afinidad por corticosterona que por cortisol que es el glucocorticoide principal en estas especies. Sin embargo, este comportamiento sería consistente con el hecho que corticosterona tiene acción mineralocorticoide más potente que cortisol [568].

La metabolización de dexametasona por la 11β–HSD es característico de la isoforma 2 ya que la isoforma 1 no lo utiliza como sustrato [188]. La 11β–HSD-2 clonada y expresada de rata [503] o humano [230,501,574] y microsomas de riñón de rata [576] o humano [500] metabolizan dexametasona en 11-dehidrodexametasona. La 11β–HSD-2 bovina también es capaz de metabolizar dexametasona tanto en células enteras (Fig. 3.5.11) como en homogenatos suplementados con NAD^+ com cofactor (Fig. 3.5.13).

La 11β–HSD-2 bovina no presentó actividad de reductasa con 11-dehidrocorticosterona o cortisona pero sí con 11-dehidrodexametasona; esto podría deberse a cierto comportamiento especial observado con los derivados fluorados del cortisol, quizá relacionado con el K_m o la afinidad. En efecto, cuando se administra cortisol a individuos normales y se estudian sus metabolitos en orina, luego de 24 hs, el 73 % del esteroide se recupera como cortisona indicando una activa 11-oxidación presumiblemente en riñón principalmente. Cuando se administra 9α-fluorocortisol el 89 % del compuesto se recupera en orina sin metabolizar indicando una deficiente deshidrogenación. Pero cuando se administra 9α-fluorocortisona se obtiene un patrón indistinguible del anterior indicando una importante transformación de 9α-fluorocortisona en 9α-fluorocortisol [577]. Esto demuestra que los glucocorticoides naturales y sus derivados fluorados presentan un comportamiento cinético diferencial por la 11β–HSD. Resultados similares han sido informados en sistemas *in vitro* con cortes o microsomas de riñón humano [500,576,577]. Li K.X. *et al.* [503] determinaron las actividades de deshidrogenasa y reductasa de la 11β–HSD-2 de rata en células enteras obteniendo resultados similares a los presentados en este trabajo en cuanto a la especificidad de sustratos y direccionalidad de la reacción con cada uno de ellos. En cuanto a la 11β–HSD-2 de rata se comportó exclusivamente como deshidrogenasa para los pares de sustratos corticosterona/11-dehidrocorticosterona y cortisol/cortisona pero presentó una actividad de reductasa con 11-dehidrodexametasona de aproximadamente el doble que la de deshidrogenasa para dexametasona [503].

Esto indicaría que si bién la 11β–HSD-2 se comporta exclusivamente como una deshidrogenasa para los sustratos naturales (corticosterona y cortisol) y que presenta actividad de reductasa con 11-dehidrodexametasona. Este comportamiento particular de dexametasona ha hecho que deba descartarse su uso para la determinación diferencial de

11β–HSD-2 *in vivo* o en muestras con ambas isoformas como fue propuesto inicialmente por diversos autores [576].

Otra característica diferencial de la 11β–HSD-2 es su dependencia de NAD^+ como cofactor. Homogenatos de células CHOP transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 bovina presentaron una dependencia absoluta por NAD^+ como cofactor para los tres sustratos estudiados (Fig. 3.5.13). Sólo corticosterona, que presentó con NAD^+ un porcentaje de conversión de 84 %, mostró una leve conversión (1.3 %) con $NADP^+$ indicando igualmente una preferencia de más de 64 veces por NAD^+ sobre $NADP^+$.

En la Tabla 3.5.3 se presentan los resultados observados por otros autores en otros sistemas en cuanto a preferencia de cofactores por la 11β-HSD-2. Los valores informados son similares al hallado para la enzima bovina, excepto para la enzima clonado y expresada de oveja donde no se observó una preferencia tan marcada por NAD^+.

Cuando se estudió la reversibilidad de la 11β–HSD-2 en homogenatos de células transfectadas, ésta se comportó exclusivamente como una deshidrogenasa para los tres sustratos ensayados (Fig. 3.5.14). A diferencia de lo observado en células enteras no se halló actividad de reductasa con 11-dehidrodexametasona como sustrato y NAD^+ como cofactor. Esto podría deberse a la mayor labilidad de la actividad de reductasa sobre la de deshidrogenasa al romper la estructura celular como ocurre con la 11β–HSD-1 como se discutió en la sección 2 de *Resultados y Discusión*.

Estudios de inhibición de la 11β–HSD-2 bovina en células transfectadas enteras y sus homogenatos de células transfectadas mostraron que esta enzima se inhibe por cuatro conocidos inhibidores de la 11β–HSD.

En la tabla 3.5.4 se presentan los valores de IC_{50} de inhibición de la 11β-HSD-2 en fracciones libres de células provenientes de distintas fuentes por 11αOH-progesterona y 11βOH-progesterona.

En todos los casos, la inhibición observada por 11αOH-progesterona y 11βOH-progesterona en homogenatos fue similar excepto en microsomas de células transfectadas con la 11β-HSD-2 de rata [242]. Cuando 11αOH-progesterona y 11βOH-progesterona se ensayaron en células enteras, 11αOH-progesterona mostró una

Tabla 3.5.3: Actividad de 11β-HSD-2 de diversas fuentes con NAD^+ o $NADP^+$

Fuente enzimática	Actividad de 11β-HSD con NAD^+/ Actividad de 11β-HSD con $NADP^+$
Homogenatos de células CHOP transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 bovina	64 veces [este trabajo]
Homogenatos de células del túbulo colector cortical de conejo	40 veces [227]
Enzima purificada de placenta humana	Preferencia casi absoluta por NAD^+ [499]
Homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 de humano	Preferencia casi absoluta por NAD^+ [230]
Homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 de conejo	91 veces [236]
Homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 de rata	40 veces [234]
Homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β–HSD-2 de oveja	4.4 veces [231]

potencia 13 veces mayor como inhibidor que 11βOH-progesterona; en forma similar a lo observado en microsomas de rata [242] o en experimentos *in vivo* donde la infusión de 3 μg/h de 11αOH-progesterona confieren un grado similar de hipertensión que 10 μg/h de 11βOH-progesterona [279]. Otros autores han reportado valores de IC_{50} (aprox. 50-100 nM) similares para ambos derivados 11-hidroxilados de progesterona en células transfectadas en forma estable con la 11β–HSD-2 humana [202]. Diferencias experimentales y en los modelos empleados como asi también las diferencias entre especies explicarían el efecto similar o selectivo de los isómeros de 11OH-progesterona. Por otro lado, las diferencias observadas en la relación de potencias en incubaciones con microsomas y células enteras podría deberse a diferencias en la internalización celular o

Tabla 3.5.4: Constantes de inhibición por 11α y 11β OH-progesterona de la 11β-HSD-2 de distintas fuentes.

Fuente enzimática	IC_{50}		Referencia
	αOH-Prog.	βOH-Prog.	
Homogenatos de células transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina	2.41	1.71	Este trabajo
Microsomas de células transfectadas con la 11β-HSD-2 de rata	0.9	10	[242]
Microsomas de riñón de oveja	50	100	[498]
Homogenatos de línea de cariocarcinoma humano JEG-3	140	320	[292]

en la metabolización de la 11βOH-progesterona en las células lo que disminuiría la concentración efectiva de este metabolito, y diferencias en la capacidad de atravesar la membrana plasmática.

El ácido glicirretínico inhibió la 11β–HSD-2 bovina tanto en homogenatos como en células enteras transfectadas. En células CHOP transfectadas el ácido glicirretínico presentó un IC_{50} de 21.5 nM similar al reportado (IC_{50} < 100 nM) en células transfectadas con la 11β–HSD-2 humana [202] pero menor al informado en células transfectadas con la 11β–HSD-2 de rata donde se halló un IC_{50} de 67.4 nM [242]. Valores cercanos al determinado en homogenatos de células transfectadas con la 11β-HSD-2 bovina (IC_{50}= 67.4 nM) han sido reportados para la enzima purificada de placenta humana (IC_{50}= 11 nM) [499], microsomas de riñón fetal humano (IC_{50}= 8.7 nM) [201] u homogenatos de células transfectadas con cDNA de la 11β–HSD-2 de rata (IC_{50}= 15 nM) [242] (IC_{50}= 80 nM) [503] o humano (IC_{50}= 20-50 nM) [230].

La carbenexolona , el hemisuccinato del ácido glicirretínico, mostró ser el más potente inhibidor de la 11β–HSD-2 bovina en células transfectadas enteras. Otros autores también han reportado inhibición de la 11β–HSD-2 en células enteras por

carbenexolona. Se ha observado que células transfectadas con la 11β–HSD-2 humana presentaron un IC_{50} de aprox. 0.1-1 μM [202] y que carbenexolona 20 μM inhibe completamente la actividad de 11β–HSD-2 en células de túbulo colector cortical de conejo [224].

En homogenatos de células transfectadas con la 11β–HSD-2 bovina, carbenexolona presentó una menor potencia como inhibidor (IC_{50}= 96.2 nM). Se ha observado que carbenexolona también inhibe a la 11β–HSD-2 en sistemas libres de células como microsomas de riñón de oveja (IC_{50}= 50-100 nM) [508], o la enzima purificada de placenta humana (IC_{50}= 18 nM) [499] o el cDNA de la 11β–HSD-2 de conejo expresada en ovocitos de *Xenopus* [236] o microsomas de túbulo colector cortical de conejo oveja (IC_{50}= 50 nM) [227].

Los estudios con inhibidores muestran que la 11β–HSD-2 bovina clonada y expresada en células CHOP presenta un comportamiento frente a los compuestos ensayados similar a su contraparte en otras especies.

La determinación de los K_m aparentes en homogenatos de células transfectadas con la 11β–HSD-2 bovina arrojó valores de 5, 45 y 71 nM para corticosterona, cortisol y dexametasona respectivamente. Los valores reportados de K_m en otras especies y sistemas para corticosterona se hallan en el rango 0.7-40 nM [201,227,230,231,234,236,292,498,499,501] y para cortisol en el rango 15-69 nM [201,230,231,349,499-501,508] en homogenatos o fracciones microsomales. Los valores obtenidos para la 11β–HSD-2 bovina se hallan comprendidos en estos rangos. El valor de K_m obtenido para cortisol fue 9 veces mayor que el del corticosterona. Relaciones similares han sido halladas en otros sistemas como microsomas de riñón fetal humano (4.6 veces) [201], la enzima purificada de plancenta humana (3.6 veces) [499] o el cDNA clonado y expresado de oveja (21 veces) [231] o humano (9-12 veces) [230,501]. Valores de K_m ap. para dexametasona de 80 nM en microsomas de riñón humano [500] y 119 nM para la enzima purificadad de placenta humana [499] son cercanos al valor hallado de 71 nM para la 11β–HSD-2 bovina.

La 11β–HSD-2 bovina presentó valores de K_m ap. muy cercanos a los reportados para la enzima de origen humano. Los valores obtenidos de K_m ap. son de 5 nM para

corticosterona (vs. humanos: 5 nM [230,501], 12 nM [499]), 45 nM para cortisol (vs humanos: 25 nM [500], 31 nM [349], 43 nM [499], 47 nM [230]) y 71 nM para dexametasona (vs. humanos: 80 nM [500], 119 nM [499]).

El único estudio reportado de determinación de K_m ap. utilizando el mismo sistema en paralelo para los tres sustratos es el que utilizó la enzima purificada de placenta humana [499] que arrojó valores de K_m ap. y relaciones (corticosterona: 12 nM, cortisol: 43 nM, dexametasona: 119 nM) muy similares a los obtenidos con la 11β–HSD-2 bovina (corticosterona: 5 nM, cortisol: 45 nM, dexametasona: 71 nM).

Los K_m ap. para los sustratos esteroideos pueden ser determinados en células enteras. En estos casos, no sería la determinación de un K_m del tipo "clásico" ya que además involucraría la internalización del sustrato a la célula y su transporte hasta la enzima que lo metaboliza. Sin embargo, este tipo de determinaciones es de suma importancia ya que nos indica la factibilidad fisiológica de dicho proceso metabólico. Los tres sustratos mostraron valores de K_m ap. determinados en células enteras mayores a los hallados en homogenatos de las mismas células transfectadas. En forma similar a lo hallado en homogenatos, el K_m ap. para corticosterona fue menor que el de cortisol (141 vs. 322 nM). Resultados similares fueron informados para la línea celular JEG-3 donde en la fracción microsomal se informó un valor de K_m ap. de 31 nM y en las células enteras de 131 nM para cortisol [349]. Un valor similar de K_m ap. para cortisol al observado con la 11β–HSD-2 bovina (231 nM) fue reportado para células transfectadas con la 11β–HSD-2 humana (190 nM) [202]. Valores informados de K_m ap. para corticosterona en células aisladas de túbulo colector renal de conejo también se hallan en el rango nanomolar (51-68 nM) [224] y son menores que los observado con cortisol. El valor de K_m ap. para dexametasona en células enteras fue de 226 nM, menor al de cortisol indicando probablemente diferencias en la permeabilidad celular de los distintos esteroides. El único informe de determinación de K_m ap. para dexametasona utilizando células transfectadas con el cDNA de rata reportó un valor de 2.7 μM llamativamente elevado.

Los datos bioquímicos hasta aquí presentados del cDNA de la 11β–HSD-2 bovina indican que nos hallaríamos ante la isoforma de tipo 2 de esta enzima ya que cumple con todos los parámetros característicos. A saber, funciona exclusivamente como una

deshidrogenasa (salvo para 11-dehidrodexametasona en células enteras), es dependiente de NAD^+ como cofactor, metaboliza dexametasona, es inhibible por ácido glicirretínico, carbenexolona, 11αOH-progesterona y 11βOH-progesterona y presenta valores de K_m ap. para todos sus sustratos en el rango nanomolar.

Por último, se estudió la distribución tisular de la 11β–HSD-2 bovina mediante RT-PCR (Fig. 3.5.16). Se observó alta expresión de 11β–HSD-2 en riñón, colon y adrenal bovinos. El riñón y el colon, junto con las glándulas salivares, son los órganos blanco de los mineralocorticoides por excelencia. La distribución de la 11β–HSD ha sido estudiada en diversas especies mediante técnicas inmunoquímicas [238,310,392], Northern-blot [230,231,234,235,392,394,499,578], RT-PCR [234,236,370,390,393] o hibridización *in situ* [377,391]. Se ha observado un alto nivel de expresión de 11β–HSD-2 en los tejidos blanco de los mineralocorticoides como ser riñón, colon y glándula salival. La expresión de 11β–HSD-2 en estos tejidos se ha evidenciado en todas las especies estudiadas incluyendo humano [230,389,390,499], mono [578], oveja [231,394], rata [234,310,370,391-393], ratón [235] y conejo [236,238]. La 11β–HSD-2 ha sido localizada dentro del riñón por inmunohistoquímica en el humano [232,239,579], rata [310] y conejo [238]. En todas las especies los mayores niveles proteicos de 11β–HSD-2 se hallan en el túbulo colector cortical, lo cual se halla en estrecha correlación con la actividad de 11β–HSD-2 observada previamente en este segmento [223,224].

En la glándula adrenal bovina se observó un alto nivel de expresión de 11β–HSD-2 semejante al hallado en los órganos blanco de los mineralocorticoides. Similares resultados se hallaron en humano [389,390], rata [234,310,391-393], oveja [231,394] y conejo [238]. Es llamativa la ausencia de expresión de 11β–HSD-2 en la glándula adrenal de ratón [235] especialmente por los altos niveles hallados en todas las demás especies estudiadas. Como se ha postulado en las secciones 3 y 4 de *Resultados y Discusión* la 11β–HSD-2 adrenal podría tener un rol en la regulación de la corticosteroidogénesis.

Se observaron bajos niveles de expresión de 11β–HSD-2 en hígado y pulmón bovino mientras que fue indetectable en corazón (Fig. 3.5.16).

Diversos autores no han evidenciado expresión de 11β–HSD-2 en hígado mediante técnicas de Northern-blot o Western-blot en humano [230,499], oveja [231,394], mono [578], ratón [235] y conejo [238]. En rata, tampoco han observado expresión de 11β–HSD-2 en hígado [370,391] mientras que otros han informado resultados positivos [234,310]. La expresión de 11β–HSD-2 en hígado se ha evidenciado por RT-PCR [234] como en este trabajo. Por otro lado, por inmunohistoquímica se ha observado tinción de células epiteliales de los conductos biliares intrahepáticos [310].

Un caso similar ocurre en pulmón donde diversos autores no han hallado expresión en humano [230,499] o ratón [235]. Sin embargo, se ha detectado expresión en rata mediante Western-blot [310] o RT-PCR [234] aunque en este último caso los resultados del Northern-blot fueron negativos. Estudios recientes han evidenciado reacción positiva con anticuerpos anti 11β–HSD-2 en el tracto respiratorio humano, específicamente en los conductos colectores de las glándulas traqueales y bronquiales, en las células epiteliales ciliadas bronquiales y en las células epiteliales de tipo II de los alvéolos [309,580]. En todos estos tipos celulares, la 11β–HSD-2 colocaliza con el receptor de mineralocorticoides.

La falta de expresión de 11β–HSD-2 en corazón también ha sido observada en distintas especies [230,231,235,238,394,578] pero fue detectada mediante RT-PCR en rata [234]. Por otro lado, en corazón humano se ha informado la co-localización de la 11β–HSD-2 con el receptor de mineralocorticoides [360] como determinaciones de actividad de 11β–HSD de tipo 2 [359].

La discrepancia de resultados entre los diversos autores y especies de la expresión de 11β–HSD-2 en estos tejidos podría deberse a que ésta se halla restringida a sólo algunos tipos celulares en estos órganos. Esto llevaría a que la 11β–HSD-2 fuese sólo detectable bajo ciertas condiciones experimentales y utilizando técnicas altamente sensibles.

Estos resultados indican que la distribución tisular de la 11β–HSD-2 bovina es similar a otras especies, predominando en tejidos epiteliales donde proteje al receptor de mineralocorticoides de los altos niveles circulantes de glucocorticoides.

La alta expresión en la adrenal explicaría la observación de que dos metabolitos frecuentemente aislados de incubaciones adrenales en diversas especies

17α-hidroxilantes sean cortisona y 11-dehidrocorticosterona [581,582]. La conversión de cortisol en cortisona por preparaciones adrenales de 11β-hidroxilasa ha sido atribuida al citocromo P-$450_{11\beta\text{-hidroxilasa}}$ [583], pero es muy probable que estas preparaciones purificadas se hallaran contaminadas con la muy abundantes 11β–HSD-2.

A MODO DE CONCLUSIÓN

Los productos de la glándula adrenal, entre ellos los esteroideos, son esenciales para la vida, por lo que su carencia causa distintos síndromes que pueden llevar a la muerte. Sin embargo, no es menos cierto que un exceso de los mismos causa otra serie de desórdenes funcionales con consecuencias no menos importantes. Por lo tanto, la fina y exquisita regulación de la síntesis y secreción de los metabolitos biosintetizados por esta glándula es en sí misma un punto clave para la vida que justifica su estudio.

Uno de los principales caminos biosintéticos de la glándula adrenal es la biosíntesis de esteroides, especialmente los glucocorticoides y los mineralocorticoides. Es por ello que el estudio de dichos caminos biosintéticos son de suma importancia y han sido el motivo de investigación del presente trabajo.

ET-1 es un estimulador de la esteroidogénesis adrenal, produciendo aumento de los niveles de aldosterona por incremento de la incorporación de colesterol a la célula adrenal (receptores ET_B) y aumento de la conversión de colesterol en pregnenolona (receptores ET_A). Quizás estos efectos de ET están relacionados al efecto aldosteronogénico *per se* de ET-1 y a su efecto potenciador de la acción de ACTH y angiotensina II, los cuales son mediadas por los receptores ET_B y ET_A respectivamente. A continuación se detallan los subtipos de receptores a ET involucrados en distintas respuestas esteroidogénicas de esta hormona, a saber:

Efecto	ET_A	ET_B
Aumento aldosteronogénesis	-	+
Potenciaciación del efecto aldosteronogénico de ACTH y angiotensina II	+	
Colesterol→Pregnenolona	+	
Pregnenolona→Progesterona		
11-Desoxicorticosterona→Aldosterona		+
Aumento del influjo de Ca^{2+}		+
Aumento de la actividad de PKC	+	
Aumento de la actividad de la Na^+/K^+-ATPasa		+

Así, se ha contribuido al entendimiento de las acciones esteroidogénicas adrenales de la ET-1, en este caso en relación a la zona glomerulosa.

La adrenal de rata expresa actividad de ambas isoformas de la 11β-HSD, las cuales presentan características bioquímicas diferentes tal como se detalla en la tabla a continuación:

Característica estudiada	11β-HSD-1	11β-HSD-2
Actividad en adrenal de rata (zona fasciculata)	+	+
Dependencia del pH de las reacciones de deshidrogenasa y reductasa	+	+
Reversibilidad	+	- (ó mínima)
K_m para corticosterona	5.11 μM	34.7 nM
Inhibición por 11-dehidrocorticosterona (IC_{50})	9.3 μM	0.186 μM
Inhibición por ácido glicirretínico (IC_{50})	0.017 nM	2.09 nM
Inhibición por 11αOH-progesterona (IC_{50})	3.7 nM	0.93 nM
Distribución subcelular	Microsomal (principalmente)	Microsomal (principalmente)

Estos resultados también confirman definitivamente la presencia de ambas isoformas de 11β-HSD en adrenal de rata por similitud con los valores de los parámetros relevados en comparación con los publicados para otras especies animales y para otros órganos.

La administración aguda de ACTH *in vivo* provoca una disminución de la actividad de ambas isoformas de 11β-HSD mientras que la administración crónica produce un aumento de esta actividad enzimática. Tratamientos agudos con ACTH de células dispersas de fasciculata adrenal de rata también provocan una disminución de la actividad de ambas isoformas determinada en la fracción microsomal. Esta disminución

de la actividad también se observa cuando la determinación enzimática se realiza en células enteras.

La inhibición de la actividad de 11β-HSD causada por ACTH sería mediada por una proteína kinasa A ya que es revertida por el pretratamiento con staurosporina y H-89. El efecto de ACTH es parcialmente simulado por db-cAMP, indicando en su conjunto que el efecto de ACTH posiblemente sea mediado por la vía del cAMP-PKA. El tratamiento de la fracción microsomal con fosfatasa alcalina produce un incremento de la actividad de la 11β-HSD-2 indicando que algún mecanismo de fosforilación regula la disminución de la actividad de esta enzima.

De esta forma se prueba una acción de regulación de la actividad de 11β-HSD, avanzándose en su mecanismo de acción. Que ACTH, como principal estimulador de la función glucocorticoidea, inhiba la metabolización de corticosterona (principal glucocorticoide en la rata) a un compuesto hormonalmente inactivo resulta lógico con aquel fin. Por otro lado, dicha inhibición desaparece y/o se convierte en estimulación cuando se realiza un tratamiento crónico con ACTH, después del cual los niveles de corticosterona retornan a los niveles basales. La siguiente tabla resume estas situaciones:

Tratamiento	Nivel de corticosterona (Tratado/Control)	Actividad de 11β-HSD-2 adrenal (Tratado/Control)
ACTH agudo	24.1	0.28
ACTH crónico	0.84	3.52

Valores calculados a partir de los resultados mostrados en las Secciones anteriores.

Finalmente, se realizó el clonado, expresión y caracterización de la 11β-HSD-2 bovina. El cDNA de la 11β-HSD-2 bovina presentó características similares a las halladas en otras especies y su distribición tisular se halla preferencialmente en tejidos blanco de los mineralocorticoides (riñón y colon) y adrenal. Dado que el clonado de la 11β-HSD-2 bovina no está reportado, este trabajo contribuye originalmente al conocimiento básico

de dicha enzima con fines estructurales y genómicos. A continuación se detallan las principales características bioquímicas halladas en homogenatos de células transfectadas con el cDNA de la 11β-HSD-2 bovina:

Característica estudiada	Resultados obtenidos
Dependencia de cofactor (B, F, D)*	NAD^+ para los sustratos 11-reducidos
Reversibilidad de la reacción (B, F, D)	Irreversible (excepto, parcialmente, para 11-dehidrodexametasona)
K_m para sustratos 11-reducidos (B, F, D)	Cortisol: 45.6 nM
	Corticosterona: 5.5 nM
	Dexametasona: 71.8 nM
Inhibición (IC_{50})	Ácido glicirretínico: 67.4 nM
	Carbenexolona: 96.2 nM
	11αOH-progesterona: 2.41 nM
	11βOH-progesterona: 1.71 nM

*B: corticosterona, F: cortisol, D: dexametasona.

Todos los resultados hallados en este trabajo de Tesis han tratado de aportar un mayor grado de conocimiento acerca de la regulación de la esteroidogénesis adrenal. Por otro lado, en nuestro laboratorio creemos que una de las principales pruebas de pertinencia de un trabajo de investigación está dado por la existencia de:

i) Aportes concretos, originales y comprobables; y

ii) Nuevos interrogantes que profundicen el detalle del aporte o abran nuevos.

En lo ya dicho se demostrado la primera. En lo que sigue se listan algunos nuevos interrogantes emergentes a partir de los aportes logrados:

i) El incremento de la conversión de colesterol en pregnenolona causado por ET-1 es mediado por la subpoblación de receptores ET_A, será éste un paso clave en el

proceso de potenciación de la respuesta aldosteronogénica de ACTH y angiotensina II ? Aquel incremento es mediado por PKC ?

ii) El incremento de la conversión de colesterol en pregnenolona provocado por ET-1 es un efecto directo sobre el citocromo P-450$_{scc}$ o el paso que se halla incrementado es el pasaje del colesterol a la membrana interna mitocondrial aumentándose así la disponibilidad de sustrato ?

iii) Ya que la alta actividad basal de 11β-HSD-2 adrenal podria estar regulando la corticosteroidogénesis basal, qué motivo tan importante existe para que aproximadamente la mitad de los glucocorticoides biosintetizados estén siendo inactivados continuamente ? Es la 11β-HSD-2 adrenal uno de los mecanismos de regulación de los ritmos diarios de secreción de glucocorticoides ?

iv) Qué factores proteicos (proteínas, proteínas quinasas, etc.) o de otro tipo median la inhibición de la 11β-HSD-2 adrenal mediada por ACTH, probablemente luego de estar involucrada la vía del cAMP-PKA ? Es la 11β-HSD-2 adrenal una fosfoproteína ? Se regula su grado de fosforilación *in vivo* por efecto de hormonas como ACTH ?

v) El receptor de mineralocorticoides humano presenta una afinidad similar por cortisol y corticosterona pero el principal glucocorticoide en circulación es el cortisol. Sin embargo, la 11β-HSD-2 de humano presenta una afinidad mucho mayor por corticosterona que por cortisol. Ocurre algo similar para la 11β-HSD-2 bovina y en esta especie el cortisol también es el principal gucocorticoide. Esta aparente discrepancia bien podría deberse a un hecho fortuito o, el gran interrogante es, esto oculta algún otro motivo por el que es de suma importancia evitar la interacción de la corticosterona con el receptor de glucocorticoides en humanos y bovinos ?

(Esta lista de nuevos interrogantes no es limitativa de muchos otros y sólo pretende demostrar su existencia).

Estos interrogantes demuestran claramente que más que un punto final, esto es un nuevo punto de partida en la búsqueda de nuevos conocimientos (y muy probablemente, de más nuevos interrogantes).

Damián G Romero

Eduardo M. Cozza

BIBLIOGRAFÍA

1. Orth, D.N., Kovacs, W.J., y DeBold, C.R. (1992). The adrenal cortex. En: *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, J.D. y Foster, D.W., Eds.), pág. 489-605, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
2. Munro Neville, A. y O'Hare, M.J. (1982). Historical aspects. En: *The human adrenal cortex* (Munro Neville, A. y O'Hare, M.J., Eds.), pág. 2-8, Springer-Verlag, Berlin.
3. Norris, D.O. (1997). The mammalian adrenal glands: cortical and chromafin cells. En: *Vertebrate endocrinology* (Norris, D.O., Ed.), pág. 299-326, Academic Press, Inc.,
4. Munro Neville, A. y O'Hare, M.J. (1982). Structure of the adult adrenal cortex. En: *The human adrenal cortex* (Munro Neville, A. y O'Hare, M.J., Eds.), pág. 16-34, Springer-Verlag, Berlin.
5. Gwynne, J.T. y Strauss, J.F. (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* **3**: 299-329.
6. Faust, J.R., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977). Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **252**: 4861-4871.
7. Kovanen, P.T., Schneider, W.J., Hillman, G.M., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1979). Separate mechanisms for the uptake of high and low density lipoproteins by mouse adrenal gland in vivo. *J. Biol. Chem.* **254**: 5498-5505.
8. Brown, M.S., Kovanen, P.T. y Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent. Prog. Horm. Res.* **35**: 215-257.
9. Kita, T., Beisiegel, U., Goldstein, J.L., Schneider, W.J. y Brown, M.S. (1981). Antibody against low density lipoprotein receptor blocks uptake of low density lipoprotein (but not high density lipoprotein) by the adrenal gland of the mouse in vivo. *J. Biol. Chem.* **256**: 4701-4703.
10. Kovanen, P.T., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1979). Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.* **254**: 11367-11373.
11. Kovanen, P.T., Basu, S.K., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1979). Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue. *Endocrinology* **104**: 610-616.
12. Kovanen, P.T., Faust, J.R., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1979). Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor- mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells. *Endocrinology* **104**: 599-609.
13. Kovanen, P.T., Goldstein, J.L., Chappell, D.A. y Brown, M.S. (1980). Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo. *J. Biol. Chem.* **255**: 5591-5598.

14. Gwynne, J.T. y Hess, B. (1980). The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* **255**: 10875-10883.

15. Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. y Schneider, W.J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1:1-39**: 1-39.

16. Shima, S., Mitsunaga, M. y Nakao, T. (1972). Effect of ACTH on cholesterol dynamics in rat adrenal tissue. *Endocrinology* **90**: 808-814.

17. Miller, W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* **9**: 295-318.

18. Stocco, D.M. y Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* **17**: 221-244.

19. Lauber, M. y Muller, J. (1989). Purification and characterization of two distinct forms of rat adrenal cytochrome P450(11) beta: functional and structural aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 109-119.

20. Lauber, M., Sugano, S., Ohnishi, T., Okamoto, M. y Muller, J. (1987). Aldosterone biosynthesis and cytochrome P-45011 beta: evidence for two different forms of the enzyme in rats. *J. Steroid Biochem.* **26**: 693-698.

21. Nonaka, Y. y Okamoto, M. (1991). Functional expression of the cDNAs encoding rat 11 beta-hydroxylase [cytochrome P450(11 beta)] and aldosterone synthase [cytochrome P450(11 beta, aldo)]. *Eur. J. Biochem.* **202**: 897-902.

22. Okamoto, M. y Nonaka, Y. (1992). Molecular biology of rat steroid 11 beta-hydroxylase [P450(11 beta)] and aldosterone synthase [P450(11 beta, aldo)]. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**: 415-419.

23. Ogishima, T., Mitani, F. y Ishimura, Y. (1989). Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **264**: 10935-10938.

24. Ho, M.M. y Vinson, G.P. (1993). 11 beta-Hydroxylase gene expression in the rat adrenal cortex. *J. Endocrinol.* **139**: 301-306.

25. Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F. y Ishimura, Y. (1992). Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* **130**: 2971-2977.

26. Lauber, M., Boni-Schnetzler, M. y Muller, J. (1990). Potassium raises cytochrome P-45011 beta mRNA level in zona glomerulosa of rat adrenals. *Mol. Cell Endocrinol.* **72**: 159-166.

27. Muller, J. y Oertle, M. (1993). Separate induction of the two isozymes of cytochrome P-450(11) beta in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **47**: 213-221.

28. Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K. y Imura, H. (1992). Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 1458-1462.

29. Domalik, L.J., Chaplin, D.D., Kirkman, M.S., Wu, R.C., Liu, W.W., Howard, T.A., Seldin, M.F. y Parker, K.L. (1991). Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **5**: 1853-1861.

30. Hamamoto, I., Hiwatashi, A. y Ichikawa, Y. (1986). Zonal distribution of cytochromes P-450 and related enzymes of bovine adrenal cortex--quantitative assay of concentrations and total contents. *J. Biochem. (Tokyo.)* **99**: 1743-1748.

31. Hornsby, P.J. y Crivello, J.F. (1983). The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: A background review. *Mol. Cell Endocrinol.* **30**: 1-20.

32. Hornsby, P.J. y Crivello, J.F. (1983). The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Mol. Cell Endocrinol.* **30** : 123-147.

33. Norris, D.O. (1997). The molecular bases for chemical regulation. En: *Vertebrate endocrinology* (Norris, D.O., Ed.), pág. 23-84, Academic Press, Inc.,

34. Dexter, R.N., Fishman, L.M., Ney, R.L. y Liddle, G.W. (1967). Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: studies of the mechanism of action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**: 473-480.

35. Fishman, L.M., Liddle, G.W., Island, D.P., Fleischer, N. y Kuchel, O. (1967). Effects of amino-glutethimide on adrenal function in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**: 481-490.

36. Liddle, G.W., Island, D.P. y Lang, U. (1958). Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment witn a chemical inhibitor of 11beta-hydroxylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **18**: 906-912.

37. Jenkins, J.S., Meakin, J.W. y Nelson, D.H. (1958). Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* **128**: 478-480.

38. coppage, w.s., Island, D.P. y smith, m. (1959). Inhibition af aldosterone secretion and modification of electrolyte excretion in man by a chemical inhibitor of 11 beta-hydroxylation. *J. Clin. Invest.* **38**: 2101-2109.

39. Goldman, A.S. (1967). Experimental congenital adrenocortical hyperplasia: persistent postnatal deficiency in activity of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase produced in utero. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**: 1041-1049.

40. Norris, D.O. (1997). Organization of the mammalian hypothalamo-hypophiseal axis. En: *Vertebrate endocrinology* (Norris, D.O., Ed.), pág. 104-164, Academic Press, Inc.,

41. Herbert, E., Comb, M., Thomas, G., Liston, D., Civelli, O., Martin, M., y Birnberg, N. (1987). Biosynthesis of ACTH and related peptides. En: *Corticotropin (ACTH)* (Li, C.H., Ed.), pág. 59-87, Academic Press, Inc., Orlando.

42. Inouye, K. y Otsuka, H. (1987). ACTH: Structure-function relationship. En: *Corticotropin (ACTH)* (Li, C.H., Ed.), pág. 1-29, Academic Press, Inc., Orlando.

43. Hall, P.F. (1985). Trophic stimulation of steroidogenesis: in search of the elusive trigger. *Recent. Prog. Horm. Res.* **41:1-39**: 1-39.

44. Long, C.N.H. (1945). The relation of cholesterol and ascorbic acid to the secretion of the adrenal cortex. *Recent. Prog. Horm. Res.* **1**: 99-124.

45. Gallo-Payet, N. y Escher, E. (1985). Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **117**: 38-46.

46. Ramachandran, J. (1987). ACTH receptors. En: *Corticotropin (ACTH)* (Li, C.H., Ed.), pág. 31-57, Academic Press, Inc., Orlando.

47. Buckley, D.I. y Ramachandran, J. (1981). Characterization of corticotropin receptors on adrenocortical cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 7431-7435.

48. Simpson, E.R. y Waterman, M.R. (1989). Steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex and its regulation by adrenocorticotropin. En: *Endocrinology* (DeGroot, J.L., Ed.), pág. 1543-1555, W. B. Saunders Company, Philadelphia.

49. Lehoux, J.G., Fleury, A. y Ducharme, L. (1998). The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. *Endocrinology* **139**: 3913-3922.

50. Omura, T. y Morohashi, K. (1995). Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 19-25.

51. Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**: 779-804.

52. Gill, G.N. (1972). Mechanism of ACTH action. *Metabolism* **21**: 571-588.

53. Maier, R. y Staehelin, M. (1968). Adrenal responses to corticotrophin in the presence of an inhibitor of protein synthesis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **58**: 619-629.

54. Rao, A.J., Long, J.A. y Ramachandran, J. (1978). Effects of antiserum to adrenocorticotropin on adrenal growth and function. *Endocrinology* **102**: 371-378.

55. Quinn, S.J. y Williams, G.H. (1988). Regulation of aldosterone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **50:409-26**: 409-426.

56. Funder, J.W. (1993). Aldosterone action. *Annu. Rev. Physiol.* **55:115-30**: 115-130.

57. Vanhoutte, P.M. (1999). How to assess endothelial function in human blood vessels. *J. Hypertens.* **17**: 1047-1058.

58. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. y Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665.

59. Furchgott, R.F. y Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.

60. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.

61. Hickey, K.A., Rubanyi, G., Paul, R.J. y Highsmith, R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **248**: C550-C556

62. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. y Masaki, T. (1988). A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca2+ channels. *J. Hypertens. Suppl.* **6**: S188-91.

63. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. y Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 2863-2867.

64. Prakask, O. y Gulati, A. (1995). Structure-activity relationship of endothelin. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 35-52, Harwood Academic Publishers, Singapore.

65. Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. y Masaki, T. (1989). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* **264**: 14954-14959.

66. Ortega, M.A. y de Artinano, A.A. (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol. Res.* **36**: 339-351.

67. Rubanyi, G.M. y Polokoff, M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**: 325-415.

68. Stephenson, K., Gandhi, C.R. y Olson, M.S. (1994). Biological actions of endothelin. *Vitam. Horm.* **48:157-98**: 157-198.

69. Rebello, S. y Gulati, A. (1995). Pharmacological interactions of endothelin with various regulatory agents. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 69-98, Harwood Academic Publishers, Singapore.

70. Singh, G., Sharma, A.C., Rebello, S., y Gulati, A. (1995). Biological activities of endothelin ant their clinical significance. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 99-116, Harwood Academic Publishers, Singapore.

71. Barengolts, E.I. (1995). Endothelin: Role in endocrine disorders. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 279-306, Harwood Academic Publishers, Singapore.

72. Benigni, A. y Remuzzi, G. (1999). Endothelin antagonists. *Lancet* **353**: 133-138.

73. Lee, M.E., Bloch, K.D., Clifford, J.A. y Quertermous, T. (1990). Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J. Biol. Chem.* **265**: 10446-10450.

74. Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. y Marumo, F. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* **18**: 165-170.

75. Haynes, W.G. y Webb, D.J. (1998). Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* **16**: 1081-1098.

76. Webb, D.J., Monge, J.C., Rabelink, T.J. y Yanagisawa, M. (1998). Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends. Pharmacol. Sci.* **19**: 5-8.

77. Masaki, T. (1995). The discovery of endothelin: Inpact on Biomedicine. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 1-12, Harwood Academic Publishers, Singapore.

78. Matsumara, Y., Takaoka, M., Hisaki, K., y Morimoto, S. (1995). Endothelin-converting enzyme and its inhibitors: Patophysiological significances. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 53-68, Harwood Academic Publishers, Singapore.

79. Davenport, A.P., Maguire, J.J., y Karet, F.E. (1995). Endothelin receptors and their sub-types. En: *Endothelin: Role in health and disease* (Gulati, A., Ed.), pág. 13-24, Harwood Academic Publishers, Singapore.

80. Hirata, Y., Kanno, K., Watanabe, T.X., Kumagaye, S., Nakajima, K., Kimura, T., Sakakibara, S. y Marumo, F. (1990). Receptor binding and vasoconstrictor activity of big endothelin. *Eur. J. Pharmacol.* **176**: 225-228.

81. Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D. y Yanagisawa, M. (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**: 473-485.

82. Emoto, N. y Yanagisawa, M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon- sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* **270**: 15262-15268.

83. Sirvio, M.L., Metsarinne, K., Saijonmaa, O. y Fyhrquist, F. (1990). Tissue distribution and half-life of 125I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**: 1191-1195.

84. Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M. y Nishikibe, M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 1461-1465.

85. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. y Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**: 730-732.

86. Williams, D.L., Jr., Jones, K.L., Pettibone, D.J., Lis, E.V. y Clineschmidt, B.V. (1991). Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 556-561.

87. Hosoda, K., Nakao, K., Hiroshi, A., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S. y Imura, H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* **287**: 23-26.

88. Ogawa, Y., Nakao, K., Arai, H., Nakagawa, O., Hosoda, K., Suga, S., Nakanishi, S. y Imura, H. (1991). Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 248-255.

89. Davenport, A.P. y Maguire, J.J. (1994). Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in humans? *Trends. Pharmacol. Sci.* **15**: 9-11.

90. Haynes, W.G., Strachan, F.E. y Webb, D.J. (1995). Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* **92**: 357-363.

91. Cozza, E.N., Gomez-Sanchez, C.E., Foecking, M.F. y Chiou, S. (1989). Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* **84**: 1032-1035.

92. Gomez-Sanchez, C.E., Cozza, E.N., Foecking, M.F., Chiou, S. y Ferris, M.W. (1990). Endothelin receptor subtypes and stimulation of aldosterone secretion. *Hypertension* **15** : 744-747.

93. Neuser, D., Steinke, W., Theiss, G. y Stasch, J.P. (1989). Autoradiographic localization of [125I]endothelin-1 and [125I]atrial natriuretic peptide in rat tissue: a comparative study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**: S67-73.

94. Davenport, A.P., Nunez, D.J., Hall, J.A., Kaumann, A.J. y Brown, M.J. (1989). Autoradiographical localization of binding sites for porcine [125I]endothelin-1 in humans, pigs, and rats: functional relevance in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**: S166-70.

95. Cozza, E.N. y Gomez-Sanchez, C.E. (1990). Effects of endothelin-1 on its receptor concentration and thymidine incorporation in calf adrenal zona glomerulosa cells: a comparative study with phorbol esters. *Endocrinology* **127**: 549-554.

96. Pecci, A., Romero, D.G., Lantos, C.P. y Cozza, E.N. (1998). Mechanisms of action of endothelin-1 in rat adrenal. *Life Sci.* **63**: 1315-1328.

97. Morishita, R., Higaki, J. y Ogihara, T. (1989). Endothelin stimulates aldosterone biosynthesis by dispersed rabbit adreno-capsular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**: 628-632.

98. Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Meneghelli, V., Malendowicz, L.K., Kasprzak, A. y Nussdorfer, G.G. (1990). Effects of prolonged infusion with endothelin-1 on the function and morphology of rat adrenal cortex. *Peptides* **11**: 767-772.

99. Hinson, J.P., Vinson, G.P., Kapas, S. y Teja, R. (1991). The role of endothelin in the control of adrenocortical function: stimulation of endothelin release by ACTH and the effects of endothelin- 1 and endothelin-3 on steroidogenesis in rat and human adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* **128**: 275-280.

100. Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K. y Nussdorfer, G.G. (1990). Endothelin-1 acutely stimulates the secretory activity of rat zona glomerulosa cells. *Peptides* **11**: 763-765.

101. Woodcock, E.A., Little, P.J. y Tanner, J.K. (1990). Inositol phosphate release and steroidogenesis in rat adrenal glomerulosa cells. Comparison of the effects of endothelin, angiotensin II and vasopressin. *Biochem. J.* **271**: 791-796.

102. Miller, W.L., Redfield, M.M. y Burnett, J.C.J. (1989). Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J. Clin. Invest.* **83**: 317-320.

103. Goetz, K.L., Wang, B.C., Madwed, J.B., Zhu, J.L. y Leadley, R.J.J. (1988). Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* **255**: R1064-R1068

104. Pecci, A., Gomez-Sanchez, C.E., de Bedners, M.E., Lantos, C.P. y Cozza, E.N. (1993). In vivo stimulation of aldosterone biosynthesis by endothelin: loci of action and effects of doses and infusion rate. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **45**: 555-561.

105. Liu, J., Chen, R., Casley, D.J. y Nayler, W.G. (1990). Ischemia and reperfusion increase 125I-labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. *Am. J. Physiol.* **258** : H829-H835

106. Hirata, Y., Yoshimi, H., Takaichi, S., Yanagisawa, M. y Masaki, T. (1988). Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **239**: 13-17.

107. Roubert, P., Gillard, V., Plas, P., Guillon, J.M., Chabrier, P.E. y Braquet, P. (1989). Angiotensin II and phorbol-esters potently down-regulate endothelin (ET- 1) binding sites in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 809-815.

108. Cozza, E.N. y Gomez-Sanchez, C.E. (1993). Mechanisms of ET-1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production. *Am. J. Physiol.* **265**: E179-83.

109. Resink, T.J., Scott-Burden, T. y Buhler, F.R. (1988). Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157** : 1360-1368.

110. Griendling, K.K., Tsuda, T. y Alexander, R.W. (1989). Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 8237-8240.

111. Hirata, Y., Yoshimi, H., Takata, S., Watanabe, T.X., Kumagai, S., Nakajima, K. y Sakakibara, S. (1988). Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 868-875.

112. Kodama, M., Kanaide, H., Abe, S., Hirano, K., Kai, H. y Nakamura, M. (1989). Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**: 1302-1308.

113. Kim, S., Morimoto, S., Koh, E., Miyashita, Y. y Ogihara, T. (1989). Comparison of effects of a potassium channel opener BRL34915, a specific potassium ionophore valinomycin and calcium channel blockers on endothelin-induced vascular contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 1003-1008.

114. Waugh, C.J., Dockrell, M.E., Haynes, W.G., Olverman, H.J., Williams, B.C. y Webb, D.J. (1992). The potassium channel opener BRL 38227 inhibits binding of [125I]-labelled endothelin-1 to rat cardiac membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 630-635.

115. Clarke, J.G., Benjamin, N., Larkin, S.W., Webb, D.J., Davies, G.J. y Maseri, A. (1989). Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am. J. Physiol.* **257**: H2033-H2035

116. Rabelink, T.J., Kaasjager, K.A., Boer, P., Stroes, E.G., Braam, B. y Koomans, H.A. (1994). Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathophysiology. *Kidney Int.* **46**: 376-381.

117. Suzuki, S., Kajikuri, J., Suzuki, A. y Itoh, T. (1991). Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery. *Circ. Res.* **69**: 1361-1368.

118. de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. y Vane, J.R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 9797-9800.

119. Clozel, M., Breu, V., Burri, K., Cassal, J.M., Fischli, W., Gray, G.A., Hirth, G., Loffler, B.M., Muller, M. y Neidhart, W. (1993). Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365** : 759-761.

120. Pollock, D.M. y Opgenorth, T.J. (1993). Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am. J. Physiol.* **264**: R222-R226

121. Ouchi, Y., Kim, S., Souza, A.C., Iijima, S., Hattori, A., Orimo, H., Yoshizumi, M., Kurihara, H. y Yazaki, Y. (1989). Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats. *Am. J. Physiol.* **256**: H1747-H1751

122. Matsumura, K., Abe, I., Tsuchihashi, T., Tominaga, M., Kobayashi, K. y Fujishima, M. (1991). Central effect of endothelin on neurohormonal responses in conscious rabbits. *Hypertension* **17**: 1192-1196.

123. Nishimura, M., Takahashi, H., Matsusawa, M., Ikegaki, I., Sakamoto, M., Nakanishi, T., Hirabayashi, M. y Yoshimura, M. (1991). Chronic intracerebroventricular infusions of endothelin elevate arterial pressure in rats. *J. Hypertens.* **9**: 71-76.

124. Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Yoshizumi, M., Takaku, F. y Yazaki, Y. (1988). Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells [published erratum appears in FEBS Lett 1989 Feb 27;244(2):509]. *FEBS Lett.* **238**: 249-252.

125. Ito, H., Hirata, Y., Hiroe, M., Tsujino, M., Adachi, S., Takamoto, T., Nitta, M., Taniguchi, K. y Marumo, F. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* **69**: 209-215.

126. Badr, K.F., Murray, J.J., Breyer, M.D., Takahashi, K., Inagami, T. y Harris, R.C. (1989). Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J. Clin. Invest.* **83**: 336-342.

127. Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., Raine, A.E. y Ledingham, J.G. (1988). Endothelin: an important factor in acute renal failure? *Lancet* **2**: 1179-1182.

128. King, A.J., Brenner, B.M. y Anderson, S. (1989). Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am. J. Physiol.* **256**: F1051-F1058

129. Zeidel, M.L., Brady, H.R., Kone, B.C., Gullans, S.R. y Brenner, B.M. (1989). Endothelin, a peptide inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase in intact renaltubular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **257**: C1101-C1107

130. Oishi, R., Nonoguchi, H., Tomita, K. y Marumo, F. (1991). Endothelin-1 inhibits AVP-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* **261**: F951-F956

131. Tomita, K., Nonoguchi, H. y Marumo, F. (1990). Effects of endothelin on peptide-dependent cyclic adenosine monophosphate accumulation along the nephron segments of the rat. *J. Clin. Invest.* **85**: 2014-2018.

132. Kohan, D.E. y Padilla, E. (1993). Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* **91**: 1235-1240.

133. Takahashi, K., Ghatei, M.A., Jones, P.M., Murphy, J.K., Lam, H.C., O'Halloran, D.J. y Bloom, S.R. (1991). Endothelin in human brain and pituitary gland: presence of immunoreactive endothelin, endothelin messenger ribonucleic acid, and endothelin receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **72**: 693-699.

134. Matsumoto, H., Suzuki, N., Shiota, K., Inoue, K., Tsuda, M. y Fujino, M. (1990). Insulin-like growth factor-I stimulates endothelin-3 secretion from rat anterior pituitary cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**: 661-668.

135. Samson, W.K., Skala, K.D., Alexander, B. y Huang, F.L. (1991). Possible neuroendocrine actions of endothelin-3. *Endocrinology* **128**: 1465-1473.

136. Kanyicska, B., Burris, T.P. y Freeman, M.E. (1991). Endothelin-3 inhibits prolactin and stimulates LH, FSH and TSH secretion from pituitary cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 338-343.

137. Samson, W.K. y Skala, K.D. (1992). Comparison of the pituitary effects of the mammalian endothelins: vasoactive intestinal contractor (endothelin-beta, rat endothelin-2) is a potent inhibitor of prolactin secretion. *Endocrinology* **130**: 2964-2970.

138. Nakamura, S., Naruse, M., Naruse, K., Shioda, S., Nakai, Y. y Uemura, H. (1993). Colocalization of immunoreactive endothelin-1 and neurohypophysial hormones in the axons of the neural lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* **132**: 530-533.

139. Stojilkovic, S.S., Iida, T., Cesnjaj, M. y Catt, K.J. (1992). Differential actions of endothelin and gonadotropin-releasing hormone in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* **131**: 2821-2828.

140. Stojilkovic, S.S., Merelli, F., Iida, T., Krsmanovic, L.Z. y Catt, K.J. (1990). Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science* **248**: 1663-1666.

141. Makino, S., Hashimoto, K., Hirasawa, R., Hattori, T., Kageyama, J. y Ota, Z. (1990). Central interaction between endothelin and brain natriuretic peptide on pressor and hormonal responses. *Brain Res.* **534**: 117-121.

142. Shichiri, M., Hirata, Y., Kanno, K., Ohta, K., Emori, T. y Marumo, F. (1989). Effect of endothelin-1 on release of arginine-vasopressin from perifused rat hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**: 1332-1337.

143. Ritz, M.F., Stuenkel, E.L., Dayanithi, G., Jones, R. y Nordmann, J.J. (1992). Endothelin regulation of neuropeptide release from nerve endings of the posterior pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 8371-8375.

144. Ota, K., Kimura, T., Shoji, M., Inoue, M., Sato, K., Ohta, M., Yamamoto, T., Tsunoda, K., Abe, K. y Yoshinaga, K. (1992). Interaction of ANP with endothelin on cardiovascular, renal, and endocrine function. *Am. J. Physiol.* **262**: E135-E141

145. Makino, S., Hashimoto, K., Hirasawa, R., Hattori, T. y Ota, Z. (1992). Central interaction between endothelin and brain natriuretic peptide on vasopressin secretion. *J. Hypertens.* **10**: 25-28.

146. Vesci, L., Mattera, G.G., Botarelli, M., Tobia, P., Corsico, N. y Martelli, E.A. (1994). Decreased density of endothelin binding sites in adrenal glands but not in aorta, of long term infarcted rats. *Life Sci.* **55**: PL421-4.

147. Wilkes, L.C. y Boarder, M.R. (1991). Characterization of endothelin receptors on a human neuroblastoma cell line: evidence for the ETA subtype. *Br. J. Pharmacol.* **104**: 750-754.

148. Wilkes, L.C. y Boarder, M.R. (1991). Characterization of the endothelin binding site on bovine adrenomedullary chromaffin cells: comparison with vascular smooth muscle cells. Evidence for receptor heterogeneity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 628-633.

149. Cao, L.Q. y Banks, R.O. (1990). Cardiorenal actions of endothelin, Part I: Effects of converting enzyme inhibition. *Life Sci.* **46**: 577-583.

150. Cozza, E.N., Chiou, S. y Gomez-Sanchez, C.E. (1992). Endothelin-1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production. *Am. J. Physiol.* **262**: R85-9.

151. Rosolowsky, L.J. y Campbell, W.B. (1990). Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* **126**: 1860-1866.

152. Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Meneghelli, V. y Nussdorfer, G.G. (1992). Endothelin-1 stimulates mitotic activity in the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex. *Cytobios* **69**: 91-96.

153. Zeng, Z.P., Naruse, M., Guan, B.J., Naruse, K., Sun, M.L., Zang, M.F., Demura, H. y Shi, Y.F. (1992). Endothelin stimulates aldosterone secretion in vitro from normal adrenocortical tissue, but not adenoma tissue, in primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 874-878.

154. Hinson, J.P., Vinson, G.P., Kapas, S. y Teja, R. (1991). The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 381-389.

155. Yamaguchi, N. (1997). Role of ET(A) and ET(B) receptors in endothelin-1-induced adrenal catecholamine secretion in vivo. *Am. J. Physiol.* **272**: R1290-7.

156. Yamaguchi, N. (1995). Implication of L-type Ca2+ channels in noncholinergic adrenal catecholamine secretion by endothelin-1 in vivo. *Am. J. Physiol.* **269**: R287-93.

157. Naruse, M., Naruse, K. y Demura, H. (1994). Recent advances in endothelin research on cardiovascular and endocrine systems. *Endocr. J.* **41**: 491-507.

158. Cameron, L., Kapas, S. y Hinson, J.P. (1994). Endothelin-1 release from the isolated perfused rat adrenal gland is elevated acutely in response to increasing flow rates and ACTH(1-24). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 873-879.

159. Hinson, J.P., Cameron, L.A. y Kapas, S. (1996). Regulation of adrenal vascular tone: role of endothelin-1 and nitric oxide. *Endocr. Res.* **22**: 875-879.

160. Kamada, S., Kubota, T., Hirata, Y., Taguchi, M., Eguchi, S., Marumo, F. y Aso, T. (1992). Direct effect of endothelin-1 on the granuloma cells of the porcine ovary. *J. Endocrinol.* **134**: 59-66.

161. Iwai, M., Hasegawa, M., Taii, S., Sagawa, N., Nakao, K., Imura, H., Nakanishi, S. y Mori, T. (1991). Endothelins inhibit luteinization of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* **129**: 1909-1914.

162. Usuki, S., Suzuki, N., Matsumoto, H., Yanagisawa, M. y Masaki, T. (1991). Endothelin-1 in luteal tissue. *Mol. Cell Endocrinol.* **80**: 147-151.

163. Tedeschi, C., Hazum, E., Kokia, E., Ricciarelli, E., Adashi, E.Y. y Payne, D.W. (1992). Endothelin-1 as a luteinization inhibitor: inhibition of rat granulosa cell progesterone accumulation via selective modulation of key steroidogenic steps affecting both progesterone formation and degradation. *Endocrinology* **131**: 2476-2478.

164. Sakaguchi, H., Kozuka, M., Hirose, S., Ito, T. y Hagiwara, H. (1992). Properties and localization of endothelin-1-specific receptors in rat testicles. *Am. J. Physiol.* **263**: R15-R18

165. Ergul, A., Glassberg, M.K., Majercik, M.H. y Puett, D. (1993). Endothelin-1 promotes steroidogenesis and stimulates protooncogene expression in transformed murine Leydig cells. *Endocrinology* **132**: 598-603.

166. Matsumoto, H., Suzuki, N., Onda, H. y Fujino, M. (1989). Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 74-80.

167. Conte, D., Questino, P., Fillo, S., Nordio, M., Isidori, A. y Romanelli, F. (1993). Endothelin stimulates testosterone secretion by rat Leydig cells. *J. Endocrinol.* **136** : R1-R4

168. Masaki, T. (1998). The discovery of endothelins. *Cardiovasc. Res.* **39**: 530-533.

169. Schiffrin, E.L. (1998). Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J. Hypertens.* **16**: 1891-1895.

170. Kloog, Y., Ambar, I., Sokolovsky, M., Kochva, E., Wollberg, Z. y Bdolah, A. (1988). Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* **242**: 268-270.

171. Srere, P.A., Chaikoff, I.L. y Dauben, W.G. (1948). The in vitro synthesis of cholesterol from acetate by surviving adrenal cortical tissue. *J. Biol. Chem.* **176**: 829

172. Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M. y Yano, M. (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* **50**: 247-255.

173. Eguchi, S., Hirata, Y., Ihara, M., Yano, M. y Marumo, F. (1992). A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **302**: 243-246.

174. Ishikawa, K., Ihara, M., Noguchi, K., Mase, T., Mino, N., Saeki, T., Fukuroda, T., Fukami, T., Ozaki, S. y Nagase, T. (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 4892-4896.

175. Karaki, H., Sudjarwo, S.A. y Hori, M. (1994). Novel antagonist of endothelin ETB1 and ETB2 receptors, BQ-788: effects on blood vessel and small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 168-173.

176. Haynes, W.G. y Webb, D.J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone [see comments]. *Lancet* **344**: 852-854.

177. Love, M.P., Haynes, W.G., Gray, G.A., Webb, D.J. y McMurray, J.J. (1996). Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. *Circulation* **94**: 2131-2137.

178. Kiowski, W., Sutsch, G., Hunziker, P., Muller, P., Kim, J., Oechslin, E., Schmitt, R., Jones, R. y Bertel, O. (1995). Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* **346**: 732-736.

179. Krum, H., Viskoper, R.J., Lacourciere, Y., Budde, M. y Charlon, V. (1998). The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators [see comments]. *N. Engl. J. Med.* **338**: 784-790.

180. Wilson, J.D., Griffin, J.E. y Russell, D.W. (1993). Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* **14**: 577-593.

181. White, P.C., Mune, T. y Agarwal, A.K. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr. Rev.* **18**: 135-156.

182. Mason, H.L. (1950). Isolation of adrenal cortical hormones from urine: 17-hydroxycorticosterone and 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone. *J. Biol. Chem.* **182**: 131-149.

183. Monder, C. y White, P.C. (1993). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* **47:187-271**: 187-271.

184. Monder, C. (1991). Corticosteroids, receptors, and the organ-specific functions of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *FASEB J.* **5**: 3047-3054.

185. Funder, J.W. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: new answers, new questions. *Eur. J. Endocrinol.* **134**: 267-268.

186. Naray-Fejes-Toth, A., Colombowala, I.K. y Fejes-Toth, G. (1998). The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in steroid hormone specificity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**: 311-316.

187. Oppermann, U.C., Persson, B. y Jornvall, H. (1997). Function, gene organization and protein structures of 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase isoforms. *Eur. J. Biochem.* **249**: 355-360.

188. Stewart, P.M. y Krozowski, Z.S. (1999). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* **57:249-324**: 249-324.

189. Krozowski, Z. (1994). The short-chain alcohol dehydrogenase superfamily: variations on a common theme. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **51**: 125-130.

190. Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. y Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013.

191. Ozols, J. (1995). Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **270**: 2305-2312.

192. Lakshmi, V. y Monder, C. (1988). Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta- dehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* **123**: 2390-2398.

193. Agarwal, A.K., Monder, C., Eckstein, B. y White, P.C. (1989). Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta- dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**: 18939-18943.

194. Tannin, G.M., Agarwal, A.K., Monder, C., New, M.I. y White, P.C. (1991). The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **266**: 16653-16658.

195. Rajan, V., Chapman, K.E., Lyons, V., Jamieson, P., Mullins, J.J., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1995). Cloning, sequencing and tissue-distribution of mouse 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase-1 cDNA. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**: 141-147.

196. Moore, C.C., Mellon, S.H., Murai, J., Siiteri, P.K. y Miller, W.L. (1993). Structure and function of the hepatic form of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistance. *Endocrinology* **133**: 368-375.

197. Yang, K., Smith, C.L., Dales, D., Hammond, G.L. y Challis, J.R. (1992). Cloning of an ovine 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid: tissue and temporal distribution of its messenger ribonucleic acid during fetal and neonatal development. *Endocrinology* **131**: 2120-2126.

198. Duperrex, H., Kenouch, S., Gaeggeler, H.P., Seckl, J.R., Edwards, C.R., Farman, N. y Rossier, B.C. (1993). Rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid encodes oxoreductase activity in a mineralocorticoid-responsive toad bladder cell line. *Endocrinology* **132**: 612-619.

199. Low, S.C., Chapman, K.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1994). 'Liver-type' 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS- 7 cells. *J. Mol. Endocrinol.* **13**: 167-174.

200. Walker, B.R., Connacher, A.A., Lindsay, R.M., Webb, D.J. y Edwards, C.R. (1995). Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3155-3159.

201. Stewart, P.M., Murry, B.A. y Mason, J.I. (1994). Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 480-484.

202. Bujalska, I., Shimojo, M., Howie, A. y Stewart, P.M. (1997). Human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue. *Steroids* **62**: 77-82.

203. Bujalska, I.J., Kumar, S. y Stewart, P.M. (1997). Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* **349**: 1210-1213.

204. Hammami, M.M. y Siiteri, P.K. (1991). Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**: 326-334.

205. Brem, A.S., Bina, R.B., King, T. y Morris, D.J. (1995). Bidirectional activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle cells. *Steroids* **60**: 406-410.

206. Rajan, V., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *J. Neurosci.* **16**: 65-70.

207. Kotelevtsev, Y., Holmes, M.C., Burchell, A., Houston, P.M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C.R., Seckl, J.R. y Mullins, J.J. (1997). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 14924-14929.

208. Monder, C. y Lakshmi, V. (1990). Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat tissues: immunological studies. *Endocrinology* **126**: 2435-2443.

209. Krozowski, Z., Stuchbery, S., White, P., Monder, C. y Funder, J.W. (1990). Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression: identification of multiple unique forms of messenger ribonucleic acid in the rat kidney. *Endocrinology* **127**: 3009-3013.

210. Krozowski, Z., Obeyesekere, V., Smith, R. y Mercer, W. (1992). Tissue-specific expression of an 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase with a truncated N-terminal domain. A potential mechanism for differential intracellular localization within mineralocorticoid target cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 2569-2574.

211. Moisan, M.P., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1992). Differential promoter usage by the rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1082-1087.

212. Moisan, M.P., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1992). Ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain and kidney. *Endocrinology* **130**: 400-404.

213. Yang, K., Yu, M. y Han, V.K. (1995). Identification and tissue distribution of a novel variant of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase 1 transcript. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55**: 247-253.

214. Mercer, W., Obeyesekere, V., Smith, R. y Krozowski, Z. (1993). Characterization of 11 beta-HSD1B gene expression and enzymatic activity. *Mol. Cell Endocrinol.* **92**: 247-251.

215. Oppermann, U.C., Netter, K.J. y Maser, E. (1995). Cloning and primary structure of murine 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/microsomal carbonyl reductase. *Eur. J. Biochem.* **227**: 202-208.

216. Maser, E. y Oppermann, U.C. (1997). Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur. J. Biochem.* **249**: 365-369.

217. Maser, E., Richter, E. y Friebertshauser, J. (1996). The identification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase as carbonyl reductase of the tobacco-specific nitrosamine 4- (methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone. *Eur. J. Biochem.* **238**: 484-489.

218. Agarwal, A.K., Tusie-Luna, M.T., Monder, C. y White, P.C. (1990). Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1827-1832.

219. Agarwal, A.K., Mune, T., Monder, C. y White, P.C. (1995). Mutations in putative glycosylation sites of rat 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase affect enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1248**: 70-74.

220. Edwards, C.R., Stewart, P.M., Burt, D., Brett, L., McIntyre, M.A., Sutanto, W.S., de Kloet, E.R. y Monder, C. (1988). Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* **2**: 986-989.

221. Castello, R., Schwarting, R., Muller, C. y Hierholzer, K. (1989). Immunohistochemical localization of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in rat kidney with monoclonal antibody. *Ren. Physiol. Biochem.* **12**: 320-327.

222. Rundle, S.E., Funder, J.W., Lakshmi, V. y Monder, C. (1989). The intrarenal localization of mineralocorticoid receptors and 11 beta- dehydrogenase: immunocytochemical studies. *Endocrinology* **125**: 1700-1704.

223. Bonvalet, J.P., Doignon, I., Blot-Chabaud, M., Pradelles, P. y Farman, N. (1990). Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rabbit nephron. *J. Clin. Invest.* **86**: 832-837.

224. Naray-Fejes-Toth, A., Watlington, C.O. y Fejes-Toth, G. (1991). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the renal target cells of aldosterone. *Endocrinology* **129**: 17-21.

225. Walker, B.R., Campbell, J.C., Williams, B.C. y Edwards, C.R. (1992). Tissue-specific distribution of the NAD(+)-dependent isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **131**: 970-972.

226. Mercer, W.R. y Krozowski, Z.S. (1992). Localization of an 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity to the distal nephron. Evidence for the existence of two species of dehydrogenase in the rat kidney. *Endocrinology* **130**: 540-543.

227. Rusvai, E. y Naray-Fejes-Toth, A. (1993). A new isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 10717-10720.

228. Brown, R.W., Chapman, K.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1993). Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* **132**: 2614-2621.

229. Brown, R.W., Chapman, K.E., Murad, P., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1996). Purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 from human placenta utilizing a novel affinity labelling technique. *Biochem. J.* **313**: 997-1005.

230. Albiston, A.L., Obeyesekere, V.R., Smith, R.E. y Krozowski, Z.S. (1994). Cloning and tissue distribution of the human 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol. Cell Endocrinol.* **105**: R11-7.

231. Agarwal, A.K., Mune, T., Monder, C. y White, P.C. (1994). NAD(+)-dependent isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *J. Biol. Chem.* **269**: 25959-25962.

232. Krozowski, Z., Maguire, J.A., Stein-Oakley, A.N., Dowling, J., Smith, R.E. y Andrews, R.K. (1995). Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 2203-2209.

233. Obeyesekere, V.R., Li, K.X., Ferrari, P. y Krozowski, Z. (1997). Truncation of the N- and C-terminal regions of the human 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme and effects on solubility and bidirectional enzyme activity. *Mol. Cell Endocrinol.* **131**: 173-182.

234. Zhou, M.Y., Gomez-Sanchez, E.P., Cox, D.L., Cosby, D. y Gomez-Sanchez, C.E. (1995). Cloning, expression, and tissue distribution of the rat nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **136**: 3729-3734.

235. Cole, T.J. (1995). Cloning of the mouse 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, gene: tissue specific expression and localization in distal convoluted tubules and collecting ducts of the kidney. *Endocrinology* **136**: 4693-4696.

236. Naray-Fejes-Toth, A. y Fejes-Toth, G. (1995). Expression cloning of the aldosterone target cell-specific 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase from rabbit collecting duct cells. *Endocrinology* **136**: 2579-2586.

237. Naray-Fejes-Toth, A. y Fejes-Toth, G. (1996). Subcellular localization of the type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. A green fluorescent protein study. *J. Biol. Chem.* **271**: 15436-15442.

238. Naray-Fejes-Toth, A. y Fejes-Toth, G. (1998). Extranuclear localization of endogenous 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in aldosterone target cells. *Endocrinology* **139**: 2955-2959.

239. Shimojo, M., Ricketts, M.L., Petrelli, M.D., Moradi, P., Johnson, G.D., Bradwell, A.R., Hewison, M., Howie, A.J. y Stewart, P.M. (1997). Immunodetection of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human mineralocorticoid target tissues: Evidence for nuclear localization. *Endocrinology* **138**: 1305-1311.

240. Ferrari, P., Obeyesekere, V.R., Li, K., Andrews, R.K. y Krozowski, Z.S. (1996). The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme: biochemical consequences of the congenital R337C mutation. *Steroids* **61**: 197-200.

241. Kyossev, Z.N. y Reeves, W.B. (1997). N-glycosylation is not essential for enzyme activity of 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Kidney Int.* **52**: 682-686.

242. Morita, H., Zhou, M., Foecking, M.F., Gomez-Sanchez, E.P., Cozza, E.N. y Gomez-Sanchez, C.E. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 complementary deoxyribonucleic acid stably transfected into Chinese hamster ovary cells: specific inhibition by 11 alpha-hydroxyprogesterone. *Endocrinology* **137**: 2308-2314.

243. Brien, T.G. (1981). Human corticosteroid binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **14**: 193-212.

244. Duchatelle, P., Ohara, A., Ling, B.N., Kemendy, A.E., Kokko, K.E., Matsumoto, P.S. y Eaton, D.C. (1992). Regulation of renal epithelial sodium channels. *Mol. Cell Biochem.* **114**: 27-34.

245. Horisberger, J.D. y Rossier, B.C. (1992). Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport. *Hypertension* **19**: 221-227.

246. Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housman, D.E. y Evans, R.M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**: 268-275.

247. Pearce, D. y Yamamoto, K.R. (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* **259**: 1161-1165.

248. Robertson, N.M., Schulman, G., Karnik, S., Alnemri, E. y Litwack, G. (1993). Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. *Mol. Endocrinol.* **7**: 1226-1239.

249. Krozowski, Z.S. y Funder, J.W. (1983). Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone- binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 6056-6060.

250. Beaumont, K. y Fanestil, D.D. (1983). Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology* **113**: 2043-2051.

251. Stephenson, G., Krozowski, Z. y Funder, J.W. (1984). Extravascular CBG-like sites in rat kidney and mineralocorticoid receptor specificity. *Am. J. Physiol.* **246**: F227-F233

252. Sheppard, K. y Funder, J.W. (1987). Mineralocorticoid specificity of renal type I receptors: in vivo binding studies. *Am. J. Physiol.* **252**: E224-E229

253. Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N. y Rafestin-Oblin, M.E. (1994). The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **135**: 834-840.

254. Stewart, P.M., Wallace, A.M., Valentino, R., Burt, D., Shackleton, C.H. y Edwards, C.R. (1987). Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet* **2**: 821-824.

255. Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R. y Smith, A.I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* **242**: 583-585.

256. New, M.I., Levine, L.S., Biglieri, E.G., Pareira, J. y Ulick, S. (1977). Evidence for an unidentified steroid in a child with apparent mineralocorticoid hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **44**: 924-933.

257. Ulick, S., Ramirez, L.C. y New, M.I. (1977). An abnormality in steroid reductive metabolism in a hypertensive syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **44**: 799-802.

258. Ulick, S., Levine, L.S., Gunczler, P., Zanconato, G., Ramirez, L.C., Rauh, W., Rosler, A., Bradlow, H.L. y New, M.I. (1979). A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **49**: 757-764.

259. Shimkets, R.A., Warnock, D.G., Bositis, C.M., Nelson-Williams, C., Hansson, J.H., Schambelan, M., Gill, J.R.J., Ulick, S., Milora, R.V. y Findling, J.W. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* **79**: 407-414.

260. Hansson, J.H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B. y Lifton, R.P. (1995). Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* **11**: 76-82.

261. Stewart, P.M.,'Corrie, J.E., Shackleton, C.H. y Edwards, C.R. (1988). Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol- cortisone shuttle. *J. Clin. Invest.* **82**: 340-349.

262. Mune, T., Rogerson, F.M., Nikkila, H., Agarwal, A.K. y White, P.C. (1995). Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.* **10**: 394-399.

263. Monder, C., Shackleton, C.H., Bradlow, H.L., New, M.I., Stoner, E., Iohan, F. y Lakshmi, V. (1986). The syndrome of apparent mineralocorticoid excess: its association with 11 beta-dehydrogenase and 5 beta-reductase deficiency and some consequences for corticosteroid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**: 550-557.

264. Wilson, R.C., Krozowski, Z.S., Li, K., Obeyesekere, V.R., Razzaghy-Azar, M., Harbison, M.D., Wei, J.Q., Shackleton, C.H., Funder, J.W. y New, M.I. (1995). A mutation in the HSD11B2 gene in a family with apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 2263-2266.

265. Oberfield, S.E., Levine, L.S., Carey, R.M., Greig, F., Ulick, S. y New, M.I. (1983). Metabolic and blood pressure responses to hydrocortisone in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56**: 332-339.

266. Morris, D.J. (1995). The role of steroid metabolism in protective and specificity conferring mechanisms of mineralocorticoid action. *Vitam. Horm.* **50:461-85**: 461-485.

267. Agarwal, A.K., Rogerson, F.M., Mune, T. y White, P.C. (1995). Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (type 2) isozyme of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *Genomics* **29**: 195-199.

268. Kitanaka, S., Katsumata, N., Tanae, A., Hibi, I., Takeyama, K., Fuse, H., Kato, S. y Tanaka, T. (1997). A new compound heterozygous mutation in the 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 4054-4058.

269. Stewart, P.M., Krozowski, Z.S., Gupta, A., Milford, D.V., Howie, A.J., Sheppard, M.C. y Whorwood, C.B. (1996). Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *Lancet* **347**: 88-91.

270. Obeyesekere, V.R., Ferrari, P., Andrews, R.K., Wilson, R.C., New, M.I., Funder, J.W. y Krozowski, Z.S. (1995). The R337C mutation generates a high Km 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in a family with apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3381-3383.

271. Dave-Sharma, S., Wilson, R.C., Harbison, M.D., Newfield, R., Azar, M.R., Krozowski, Z.S., Funder, J.W., Shackleton, C.H., Bradlow, H.L., Wei, J.Q., Hertecant, J., Moran, A., Neiberger, R.E., Balfe, J.W., Fattah, A., Daneman, D., Akkurt, H.I., De Santis, C. y New, M.I. (1998). Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 2244-2254.

272. Wilson, R.C., Harbison, M.D., Krozowski, Z.S., Funder, J.W., Shackleton, C.H., Hanauske-Abel, H.M., Wei, J.Q., Hertecant, J., Moran, A. y Neiberger, R.E. (1995). Several homozygous mutations in the gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in patients with apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3145-3150.

273. Riddle, M.C. y McDaniel, P.A. (1994). Renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is enhanced by ramipril and captopril. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 830-834.

274. Palermo, M., Cossu, M. y Shackleton, C.H. (1998). Cure of apparent mineralocorticoid excess by kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* **339**: 1787-1788.

275. Walker, B.R. y Edwards, C.R. (1994). Licorice-induced hypertension and syndromes of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **23**: 359-377.

276. White, P.C. (1996). Inherited forms of mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* **28**: 927-936.

277. Farese, R.V., Jr., Biglieri, E.G., Shackleton, C.H., Irony, I. y Gomez-Fontes, R. (1991). Licorice-induced hypermineralocorticoidism. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1223-1227.

278. Armanini, D., Karbowiak, I., Krozowski, Z., Funder, J.W. y Adam, W.R. (1982). The mechanism of mineralocorticoid action of carbenoxolone. *Endocrinology* **111**: 1683-1686.

279. Souness, G.W. y Morris, D.J. (1996). 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase, possess hypertensinogenic activity in the rat. *Hypertension* **27**: 421-425.

280. Souness, G.W. y Morris, D.J. (1991). The "mineralocorticoid-like" actions conferred on corticosterone by carbenoxolone are inhibited by the mineralocorticoid receptor (type I) antagonist RU28318. *Endocrinology* **129**: 2451-2456.

281. MacKenzie, M.A., Hoefnagels, W.H., Jansen, R.W., Benraad, T.J. y Kloppenborg, P.W. (1990). The influence of glycyrrhetinic acid on plasma cortisol and cortisone in healthy young volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**: 1637-1643.

282. Monder, C., Stewart, P.M., Lakshmi, V., Valentino, R., Burt, D. y Edwards, C.R. (1989). Licorice inhibits corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* **125**: 1046-1053.

283. Hierholzer, K., Siebe, H. y Fromm, M. (1990). Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its effect on epithelial sodium transport. *Kidney Int.* **38**: 673-678.

284. Latif, S.A., Conca, T.J. y Morris, D.J. (1990). The effects of the licorice derivative, glycyrrhetinic acid, on hepatic 3 alpha- and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and 5 alpha- and 5 beta-reductase pathways of metabolism of aldosterone in male rats. *Steroids* **55**: 52-58.

285. Ulick, S., Wang, J.Z., Blumenfeld, J.D. y Pickering, T.G. (1992). Cortisol inactivation overload: a mechanism of mineralocorticoid hypertension in the ectopic adrenocorticotropin syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 963-967.

286. Walker, B.R., Campbell, J.C., Fraser, R., Stewart, P.M. y Edwards, C.R. (1992). Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **37**: 483-492.

287. Diederich, S., Quinkler, M., Miller, K., Heilmann, P., Schoneshofer, M. y Oelkers, W. (1996). Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: regulation by adrenocorticotropin? *Eur. J. Endocrinol.* **134**: 301-307.

288. Stewart, P.M., Walker, B.R., Holder, G., O'Halloran, D. y Shackleton, C.H. (1995). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3617-3620.

289. Morris, D.J., Semafuko, W.E., Latif, S.A., Vogel, B., Grimes, C.A. y Sheff, M.F. (1992). Detection of glycyrrhetinic acid-like factors (GALFs) in human urine. *Hypertension* **20**: 356-360.

290. Walker, B.R., Aggarwal, I., Stewart, P.M., Padfield, P.L. y Edwards, C.R. (1995). Endogenous inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 529-533.

291. Takeda, Y., Miyamori, I., Iki, K., Inaba, S., Furukawa, K., Hatakeyama, H., Yoneda, T. y Takeda, R. (1996). Endogenous renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitory factors in patients with low-renin essential hypertension. *Hypertension* **27**: 197-201.

292. Souness, G.W., Latif, S.A., Laurenzo, J.L. y Morris, D.J. (1995). 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. *Endocrinology* **136**: 1809-1812.

293. Jamieson, P.M., Chapman, K.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1995). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* **136**: 4754-4761.

294. Ricketts, M.L., Shoesmith, K.J., Hewison, M., Strain, A., Eggo, M.C. y Stewart, P.M. (1998). Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes. *J. Endocrinol.* **156**: 159-168.

295. Lax, E.R., Ghraf, R. y Schriefers, H. (1978). The hormonal regulation of hepatic microsomal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **89**: 352-358.

296. Low, S.C., Assaad, S.N., Rajan, V., Chapman, K.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1993). Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by sex steroids in vivo: further evidence for the existence of a second dehydrogenase in rat kidney. *J. Endocrinol.* **139**: 27-35.

297. Albiston, A.L., Smith, R.E. y Krozowski, Z.S. (1995). Sex- and tissue- specific regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA. *Mol. Cell Endocrinol.* **109**: 183-188.

298. Low, S.C., Chapman, K.E., Edwards, C.R., Wells, T., Robinson, I.C. y Seckl, J.R. (1994). Sexual dimorphism of hepatic 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat: the role of growth hormone patterns. *J. Endocrinol.* **143**: 541-548.

299. Williams, L.J., Lyons, V., Wallace, R., Seckl, J.R. y Chapman, K.E. (1997). CCAAT/enhancer binding protein positively regulates the rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter in liver cells. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 235S

300. Ricketts, M.L., Verhaeg, J.M., Bujalska, I., Howie, A.J., Rainey, W.E. y Stewart, P.M. (1998). Immunohistochemical localization of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 1325-1335.

301. Marver, D. (1984). Evidence of corticosteroid action along the nephron. *Am. J. Physiol.* **246**: F111-F123

302. Roland, B.L., Krozowski, Z.S. y Funder, J.W. (1995). Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol. Cell Endocrinol.* **111**: R1-7.

303. Krozowski, Z.S., Rundle, S.E., Wallace, C., Castell, M.J., Shen, J.H., Dowling, J., Funder, J.W. y Smith, A.I. (1989). Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology* **125**: 192-198.

304. Lombes, M., Farman, N., Oblin, M.E., Baulieu, E.E., Bonvalet, J.P., Erlanger, B.F. y Gasc, J.M. (1990). Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 1086-1088.

305. Naray-Fejes-Toth, A., Rusvai, E. y Fejes-Toth, G. (1994). Mineralocorticoid receptors and 11 beta-steroid dehydrogenase activity in renal principal and intercalated cells. *Am. J. Physiol.* **266**: F76-80.

306. Stewart, P.M., Whorwood, C.B., Barber, P., Gregory, J., Monder, C., Franklyn, J.A. y Sheppard, M.C. (1991). Localization of renal 11 beta-dehydrogenase by in situ hybridization: autocrine not paracrine protector of the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **128**: 2129-2135.

307. Yau, J.L., van Haarst, A.D., Moisan, M.P., Fleming, S., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1991). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase mRNA expression in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **260**: F764-7.

308. Whorwood, C.B., Mason, J.I., Ricketts, M.L., Howie, A.J. y Stewart, P.M. (1995). Detection of human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction and localization of the type 2 isoform to renal collecting ducts. *Mol. Cell Endocrinol.* **110**: R7-12.

309. Hirasawa, G., Sasano, H., Takahashi, K., Fukushima, K., Suzuki, T., Hiwatashi, N., Toyota, T., Krozowski, Z.S. y Nagura, H. (1997). Colocalization of 11

beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 3859-3863.

310. Smith, R.E., Li, K.X., Andrews, R.K. y Krozowski, Z. (1997). Immunohistochemical and molecular characterization of the rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Endocrinology* **138**: 540-547.

311. Leckie, C., Chapman, K.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1995). LLC-PK1 cells model 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 regulation of glucocorticoid access to renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* **136**: 5561-5569.

312. Condon, J., Ricketts, M.L., Whorwood, C.B. y Stewart, P.M. (1997). Ontogeny and sexual dimorphic expression of mouse type 2 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Cell Endocrinol.* **127**: 121-128.

313. Igarreta, P., Calvo, J.C. y Damasco, M.C. (1999). Activity of renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11betaHSD2) in stressed animals. *Life Sci.* **64**: 2285-2290.

314. Walker, B.R. (1994). Organ-specific actions of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in humans: implications for the pathophysiology of hypertension. *Steroids* **59**: 84-89.

315. Alfaidy, N., Blot-Chabaud, M., Bonvalet, J.P. y Farman, N. (1997). Vasopressin potentiates mineralocorticoid selectivity by stimulating 11 beta hydroxysteroid deshydrogenase in rat collecting duct. *J. Clin. Invest.* **100**: 2437-2442.

316. Escher, G., Nawrocki, A., Staub, T., Vishwanath, B.S., Frey, B.M., Reichen, J. y Frey, F.J. (1998). Down-regulation of hepatic and renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* **114**: 175-184.

317. Escher, G., Vogt, B., Beck, T., Guntern, D., Frey, B.M. y Frey, F.J. (1998). Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the remaining kidney following nephrectomy. *Endocrinology* **139**: 1533-1539.

318. Escher, G., Galli, I., Vishwanath, B.S., Frey, B.M. y Frey, F.J. (1997). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J. Exp. Med.* **186**: 189-198.

319. Whorwood, C.B., Ricketts, M.L. y Stewart, P.M. (1994). Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon [published erratum appears in Endocrinology 1995 Apr;136(4):1774]. *Endocrinology* **135**: 2533-2541.

320. Krozowski, Z., Wendell, K., Ahima, R. y Harlan, R. (1992). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat salivary glands and distal colon: modulation by corticosteroids. *Mol. Cell Endocrinol.* **85**: 21-32.

321. Whorwood, C.B., Barber, P.C., Gregory, J., Sheppard, M.C. y Stewart, P.M. (1993). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in the rat colon. *Am. J. Physiol.* **264**: E951-7.

322. Sheppard, K.E. y Funder, J.W. (1996). Specific nuclear localization of 11-dehydrocorticosterone in rat colon: evidence for a novel corticosteroid receptor. *Endocrinology* **137**: 3274-3278.

323. Kenouch, S., Lombes, M., Delahaye, F., Eugene, E., Bonvalet, J.P. y Farman, N. (1994). Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1334-1341.

324. Teelucksingh, S., Mackie, A.D., Burt, D., McIntyre, M.A., Brett, L. y Edwards, C.R. (1990). Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetinic acid. *Lancet* **335**: 1060-1063.

325. Stewart, P.M., Rogerson, F.M. y Mason, J.I. (1995). Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 885-890.

326. Burton, P.J. y Waddell, B.J. (1994). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat placenta: developmental changes and the effects of altered glucocorticoid exposure. *J. Endocrinol.* **143**: 505-513.

327. Pepe, G.J., Babischkin, J.S., Burch, M.G., Leavitt, M.G. y Albrecht, E.D. (1996). Developmental increase in expression of the messenger ribonucleic acid and protein levels of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the baboon placenta. *Endocrinology* **137**: 5678-5684.

328. Shams, M., Kilby, M.D., Somerset, D.A., Howie, A.J., Gupta, A., Wood, P.J., Afnan, M. y Stewart, P.M. (1998). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum. Reprod.* **13**: 799-804.

329. Brown, R.W., Diaz, R., Robson, A.C., Kotelevtsev, Y.V., Mullins, J.J., Kaufman, M.H. y Seckl, J.R. (1996). The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology* **137**: 794-797.

330. Lakshmi, V., Nath, N. y Muneyyirci-Delale, O. (1993). Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: evidence for the existence of two species of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **45**: 391-397.

331. Yang, K. (1995). Co-expression of two distinct isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine placenta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**: 337-343.

332. Sun, K., Yang, K. y Challis, J.R. (1997). Differential expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 300-305.

333. Murphy, B.E. (1981). Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: a role for cortisone in human fetal development. *J. Steroid Biochem.* **14**: 811-817.

334. Stewart, P.M., Murry, B.A. y Mason, J.I. (1994). Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 1529-1532.

335. Condon, J., Gosden, C., Gardener, D., Nickson, P., Hewison, M., Howie, A.J. y Stewart, P.M. (1998). Expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 4490-4497.

336. Edwards, C.R., Benediktsson, R., Lindsay, R.S. y Seckl, J.R. (1993). Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* **341**: 355-357.

337. Benediktsson, R., Lindsay, R.S., Noble, J., Seckl, J.R. y Edwards, C.R. (1993). Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* **341**: 339-341.

338. Benediktsson, R., Calder, A.A., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1997). Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **46**: 161-166.

339. Rogerson, F.M., Kayes, K.M. y White, P.C. (1997). Variation in placental type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. *Mol. Cell Endocrinol.* **128**: 103-109.

340. Baker, M.E. (1998). Evolution of mammalian 11beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases- type 2 and retinol dehydrogenases from ancestors in Caenorhabditis elegans and evidence for horizontal transfer of a eukaryote dehydrogenase to E. coli. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **66**: 355-363.

341. Baker, M.E. (1996). Unusual evolution of 11beta- and 17beta-hydroxysteroid and retinol dehydrogenases. *Bioessays* **18**: 63-70.

342. Kitanaka, S., Tanae, A. y Hibi, I. (1996). Apparent mineralocorticoid excess due to 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a possible cause of intrauterine growth retardation. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **44**: 353-359.

343. Petrelli, M.D., Lim-Tio, S.S., Condon, J., Hewison, M. y Stewart, P.M. (1997). Differential expression of nuclear 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mineralocorticoid receptor positive and negative tissues. *Endocrinology* **138**: 3077-3080.

344. Baggia, S., Albrecht, E.D. y Pepe, G.J. (1990). Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the baboon placenta by estrogen. *Endocrinology* **126**: 2742-2748.

345. Smith, R.E., Salamonsen, L.A., Komesaroff, P.A., Li, K.X., Myles, K.M., Lawrence, M. y Krozowski, Z. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type II in the human endometrium: localization and activity during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 4252-4257.

346. Burton, P.J., Krozowski, Z.S. y Waddell, B.J. (1998). Immunolocalization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in rat uterus: variation across the estrous cycle and regulation by estrogen and progesterone. *Endocrinology* **139**: 376-382.

347. Yang, K., Fraser, M., Yu, M., Krkosek, M., Challis, J.R., Lamming, G.E., Campbell, L.E. y Darnel, A. (1996). Pattern of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid expression in the ovine uterus during the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* **55**: 1231-1236.

348. Arcuri, F., Monder, C., Lockwood, C.J. y Schatz, F. (1996). Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* **137**: 595-600.

349. Pasquarette, M.M., Stewart, P.M., Ricketts, M.L., Imaishi, K. y Mason, J.I. (1996). Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and mRNA in human choriocarcinoma cells. *J. Mol. Endocrinol.* **16**: 269-275.

350. Sun, K., Yang, K. y Challis, J.R. (1997). Differential regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 by nitric oxide in cultured human placental trophoblast and chorionic cell preparation. *Endocrinology* **138**: 4912-4920.

351. Saruta, T., Suzuki, H., Handa, M., Igarashi, Y., Kondo, K. y Senba, S. (1986). Multiple factors contribute to the pathogenesis of hypertension in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62**: 275-279.

352. Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R. y Campbell, J. (1989). Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* **125**: 2224-2226.

353. Brem, A.S., Bina, R.B., King, T. y Morris, D.J. (1997). 11BetaOH-progesterone affects vascular glucocorticoid metabolism and contractile response. *Hypertension* **30**: 449-454.

354. Walker, B.R., Connacher, A.A., Webb, D.J. y Edwards, C.R. (1992). Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control of vascular tone in man. *Clin. Sci. (Colch).* **83**: 171-178.

355. Ullian, M.E., Hazen-Martin, D.J., Walsh, L.G., Davda, R.K. y Egan, B.M. (1996). Carbenoxolone damages endothelium and enhances vasoconstrictor action in aortic rings. *Hypertension* **27**: 1346-1352.

356. Walker, B.R., Yau, J.L., Brett, L.P., Seckl, J.R., Monder, C., Williams, B.C. y Edwards, C.R. (1991). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: implications for cardiovascular responses to glucocorticoids. *Endocrinology* **129**: 3305-3312.

357. Takeda, Y., Miyamori, I., Yoneda, T., Iki, K., Hatakeyama, H. y Takeda, R. (1994). Gene expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the mesenteric arteries of genetically hypertensive rats. *Hypertension* **23**: 577-580.

358. Young, M., Fullerton, M., Dilley, R. y Funder, J. (1994). Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* **93**: 2578-2583.

359. Slight, S.H., Ganjam, V.K., Gomez-Sanchez, C.E., Zhou, M.Y. y Weber, K.T. (1996). High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**: 781-787.

360. Lombes, M., Alfaidy, N., Eugene, E., Lessana, A., Farman, N. y Bonvalet, J.P. (1995). Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* **92**: 175-182.

361. Hsueh, A.J. y Erickson, G.F. (1978). Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* **32**: 639-648.

362. Michael, A.E., Pester, L.A., Curtis, P., Shaw, R.W., Edwards, C.R. y Cooke, B.A. (1993). Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **38**: 641-644.

363. Benediktsson, R., Yau, J.L., Low, S., Brett, L.P., Cooke, B.E., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1992). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary: high expression in the oocyte. *J. Endocrinol.* **135**: 53-58.

364. Michael, A.E., Evagelatou, M., Norgate, D.P., Clarke, R.J., Antoniw, J.W., Stedman, B.A., Brennan, A., Welsby, R., Bujalska, I., Stewart, P.M. y Cooke, B.A. (1997). Isoforms of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa- lutein cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **132**: 43-52.

365. Tetsuka, M., Thomas, F.J., Thomas, M.J., Anderson, R.A., Mason, J.I. y Hillier, S.G. (1997). Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 2006-2009.

366. Michael, A.E., Gregory, L., Walker, S.M., Antoniw, J.W., Shaw, R.W., Edwards, C.R. y Cooke, B.A. (1993). Ovarian 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential predictor of conception by in-vitro fertilisation and embryo transfer. *Lancet* **342**: 711-712.

367. Phillips, D.M., Lakshmi, V. y Monder, C. (1989). Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* **125**: 209-216.

368. Leckie, C.M., Welberg, L.A. y Seckl, J.R. (1998). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat Leydig cells. *J. Endocrinol.* **159**: 233-238.

369. Monder, C., Miroff, Y., Marandici, A. y Hardy, M.P. (1994). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid- mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* **134**: 1199-1204.

370. Ge, R.S., Gao, H.B., Nacharaju, V.L., Gunsalus, G.L. y Hardy, M.P. (1997). Identification of a kinetically distinct activity of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138**: 2435-2442.

371. Moisan, M.P., Seckl, J.R. y Edwards, C.R. (1990). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology* **127**: 1450-1455.

372. Lakshmi, V., Sakai, R.R., McEwen, B.S. y Monder, C. (1991). Regional distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain. *Endocrinology* **128**: 1741-1748.

373. Seckl, J.R., Dow, R.C., Low, S.C., Edwards, C.R. y Fink, G. (1993). The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor glycyrrhetinic acid affects corticosteroid feedback regulation of hypothalamic corticotrophin-releasing peptides in rats. *J. Endocrinol.* **136**: 471-477.

374. Seckl, J.R., Kelly, P.A. y Sharkey, J. (1991). Glycyrrhetinic acid, an inhibitor of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, alters local cerebral glucose utilization in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**: 777-779.

375. Yang, K., Matthews, S.G. y Challis, J.R. (1995). Developmental and glucocorticoid regulation of pituitary 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase 1 gene expression in the ovine fetus and lamb. *J. Mol. Endocrinol.* **14**: 109-116.

376. Whorwood, C.B., Sheppard, M.C. y Stewart, P.M. (1993). Licorice inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action. *Endocrinology* **132**: 2287-2292.

377. Roland, B.L., Li, K.X. y Funder, J.W. (1995). Hybridization histochemical localization of 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat brain. *Endocrinology* **136**: 4697-4700.

378. Gomez-Sanchez, E.P. y Gomez-Sanchez, C.E. (1992). Central hypertensinogenic effects of glycyrrhizic acid and carbenoxolone. *Am. J. Physiol.* **263**: E1125-30.

379. Gomez-Sanchez, E.P., Venkataraman, M.T., Thwaites, D. y Fort, C. (1990). ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am. J. Physiol.* **258**: E649-E653

380. Ulick, S., Tedde, R. y Mantero, F. (1990). Pathogenesis of the type 2 variant of the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**: 200-206.

381. Hundertmark, S., Buhler, H., Rudolf, M., Weitzel, H.K. y Ragosch, V. (1997). Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75- 1 breast cancer cells. *J. Endocrinol.* **155**: 171-180.

382. Krozowski, Z. y Funder, J.W. (1981). Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* **109**: 1811-1813.

383. Abramovitz, M., Branchaud, C.L. y Murphy, B.E. (1982). Cortisol-cortisone interconversion in human fetal lung: contrasting results using explant and monolayer cultures suggest that 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase (EC 1.1.1.146) comprises two enzymes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**: 563-568.

384. Hundertmark, S., Buhler, H., Ragosch, V., Dinkelborg, L., Arabin, B. y Weitzel, H.K. (1995). Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in the fetal lung. *Endocrinology* **136**: 2573-2578.

385. Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. y Schutz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic

chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* **9**: 1608-1621.

386. Walker, B.R., Andrew, R., MacLeod, K.M. y Padfield, P.L. (1998). Growth hormone replacement inhibits renal and hepatic 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenases in ACTH-deficient patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **49**: 257-263.

387. Hennebold, J.D., Ryu, S.Y., Mu, H.H., Galbraith, A. y Daynes, R.A. (1996). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *Am. J. Physiol.* **270**: R1296-306.

388. Yang, K., Khalil, M.W., Strutt, B.J. y Killinger, D.W. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 activity and gene expression in human adipose stromal cells: effect on aromatase activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **60**: 247-253.

389. Stewart, P.M., Whorwood, C.B. y Mason, J.I. (1995). Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55**: 465-471.

390. Mazzocchi, G., Rossi, G.P., Neri, G., Malendowicz, L.K., Albertin, G. y Nussdorfer, G.G. (1998). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in the human adrenal cortex. *FASEB J.* **12**: 1533-1539.

391. Roland, B.L. y Funder, J.W. (1996). Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: in situ studies. *Endocrinology* **137**: 1123-1128.

392. Shimojo, M., Whorwood, C.B. y Stewart, P.M. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat adrenal. *J. Mol. Endocrinol.* **17**: 121-130.

393. Lecybyl, R., Jagodzinski, P.P., Krozowski, Z.S. y Trzeciak, W.H. (1998). Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in rat adrenocortical cells. *Endocr. Res.* **24**: 643-647.

394. Campbell, L.E., Yu, M. y Yang, K. (1996). Ovine 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene predicts a protein distinct from that deduced by the cloned kidney cDNA at the C- terminus. *Mol. Cell Endocrinol.* **119**: 113-118.

395. Avigan, J. (1958). A method for incorporating cholesterol and other lipides into serum lipoproteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **234**: 787-790.

396. Lantos, C.P., Raman, P.W., Graves, J.M., Dorfman, R.I. y Forchielli, E. (1965). The biosynthesis of 5alfa-pregnane-3,20-dione (11pregnane-dione) by cow adrenal preparations. *Steroids* **6**: 69-79.

397. Gomez-Sanchez, C.E., Foecking, M.F., Ferris, M.W., Chavarri, M.R., Uribe, L. y Gómez-Sanchez, E.P. (1987). The production of monoclonal antibodies against aldosterone. *Steroids* **49**: 581-587.

398. Gomez-Sanchez, C., Murry, B.A., Kem, D.C. y Kaplan, N.M. (1975). A direct radioimmunoassay of corticosterone in rat serum. *Endocrinology* **96**: 796-798.

399. Fleischer, S. y Kervina, M. (1974). Subcellular fractionation of rat liver. *Methods Enzymol.* **31**: 6-41.

400. Pennington, R.J. (1961). Biochemistry of distrphic muscle: Mitochondrial succinate-tetrazolium reducatase and adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* **80**: 649-654.

401. Aronson, N.N.J. y Touster, O. (1974). Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol.* **31**: 90-102.

402. Skinner, M.K. y Griswold, M.D. (1983). Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and its comparison with existing procedures. *Biochem. J.* **209**: 281-284.

403. Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **201**: 134-139.

404. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

405. Hervieu, G. A quick and safe method for destaining Coomassie-Blue-stained protein gels. Elsevier Trends Journals Techinical Tips Online (http://www.biomednet.com/db/tto, T01089) (1997).

406. Frohman, M.A., Dush, M.K. y Martin, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 8998-9002.

407. Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S. y Siebert, P.D. (1996). Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* **21**: 526-534.

408. Zhou, M.Y. y Gomez-Sanchez, C.E. (1997). Universal TA cloning. En: *Gene cloning and analysis: Current innovations* (Anónimopág. 165-178, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

409. Heffernan, M. y Dennis, J.W. (1991). Polyoma and hamster papovavirus large T antigen-mediated replication of expression shuttle vectors in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic. Acids. Res.* **19**: 85-92.

410. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72:248-54**: 248-254.

411. Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* **22**: 4673-4680.

412. Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr. y Deerfield, D.W. (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. (http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml) *EMBNEW. NEWS* **4**: 14

413. Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

414. Hinson, J.P. y Kapas, S. (1998). The role of endothelial cell products in the regulation of adrenocortical function: actions of endothelin, nitric oxide, adrenomedullin and PAMP. *Horm. Metab. Res.* **30**: 334-340.

415. Remy-Jouet, I., Cartier, F., Lesouhaitier, O., Kuhn, J.M., Fournier, A., Vaudry, H. y Delarue, C. (1998). Mechanism of action of endothelins on adrenocortical cells. *Horm. Metab. Res.* **30**: 341-345.

416. Hinson, J.P., Kapas, S., Teja, R. y Vinson, G.P. (1991). Effect of the endothelins on aldosterone secretion by rat zona glomerulosa cells in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**: 437-439.

417. Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A. y Vinson, G.P. (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis [published erratum appears in Endocr Rev 1998 Jun;19(3):301]. *Endocr. Rev.* **19** : 101-143.

418. Billiar, R.B. y Eik-Nes, K.B. (1965). Biosynthesis of corticoids in guinea pig adrenal slices the effect of ACTH on [I-14C]acetate incorporation into adrenal steroids. *Biochim. Biophys. Acta* **104**: 503-514.

419. Morris, M.D. y Chaikoff, I.L. (1959). The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: Dietary versus endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* **234**: 1095-1097.

420. Henderson, J.F. (1963). Studies on fatty liver induction by 4-amino-pyrazolopyrimidine. *J. Lipid Res.* **4**: 68-79.

421. Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1978). Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J. Biol. Chem.* **253**: 9024-9032.

422. Brecher, P.I. y Hyun, Y. (1978). Effect of 4-aminopyrazolopyrimidine and aminoglutethimide on cholesteryl metabolism and steroidogenesis in the rat adrenal. *Endocrinology* **102**: 1404-1413.

423. Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1976). Cholesterogenesis: derepression in extrahepatic tissues with 4- aminopyrazolo (3,4-d) pyrimidine. *Science* **193**: 903-905.

424. Shiff, T.S., Roheim, P.S. y Eder, H.A. (1971). Effects of high sucrose diets and 4-aminopyrazolopyrimidine on serum lipids and lipoproteins in the rat. *J. Lipid Res.* **12** : 596-603.

425. Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1976). Regulation of sterol synthesis in adrenal gland of the rat by both high and low density human plasma lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**: 880-885.

426. Balasubramaniam, S., Goldstein, J.L., Faust, J.R., Brunschede, G.Y. y Brown, M.S. (1977). Lipoprotein-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesteryl ester metabolism in the adrenal gland of the rat. *J. Biol. Chem.* **252**: 1771-1779.

427. Verschoor-Klootwyk, A.H., Verschoor, L., Azhar, S. y Reaven, G.M. (1982). Role of exogenous cholesterol in regulation of adrenal steroidogenesis in the rat. *J. Biol. Chem.* **257**: 7666-7671.

428. Jeske, D.J. y Dietschy, J.M. (1980). Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water. *J. Lipid Res.* **21** : 364-376.

429. Turley, S.D., Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1981). Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo. *J. Lipid Res.* **22**: 551-569.

430. Andersen, J.M. y Dietschy, J.M. (1979). Absolute rates of cholesterol synthesis in extrahepatic tissues measured with 3H-labeled water and 14C-labeled substrates. *J. Lipid Res.* **20**: 740-752.

431. Gwynne, J.T., Mahaffee, D., Brewer, H.B.J. y Ney, R.L. (1976). Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**: 4329-4333.

432. Dexter, R.N., Fishman, L.M. y Ney, R.L. (1970). Stimulation of adrenal cholesterol uptake from plasma by adrenocorticotrophin. *Endocrinology* **87**: 836-846.

433. Simpson, H.D., Shepherd, R., Shepherd, J., Fraser, R., Lever, A.F. y Kenyon, C.J. (1989). Effects of cholesterol and lipoproteins on aldosterone secretion by bovine zona glomerulosa cells. *J. Endocrinol.* **121**: 125-131.

434. Lehoux, J.G. y Lefebvre, A. (1991). Short-term effects of ACTH on the low-density lipoprotein receptor mRNA level in rat and hamster adrenals. *J. Mol. Endocrinol.* **6**: 223-230.

435. Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": Identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 523-558.

436. Heikkila, P., Arola, J., Liu, J. y Kahri, A.I. (1998). ACTH regulates LDL receptor and CLA-1 mRNA in the rat adrenal cortex. *Endocr. Res.* **24**: 591-593.

437. Toth, I.E. (1992). Lipoprotein receptors and steroidogenesis in adrenocortical cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**: 395-402.

438. Rigotti, A., Edelman, E.R., Seifert, P., Iqbal, S.N., DeMattos, R.B., Temel, R.E., Krieger, M. y Williams, D.L. (1996). Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J. Biol. Chem.* **271**: 33545-33549.

439. Romero, D.G., Pecci, A., Lantos, C.P. y Cozza, E.N. (1996). Endothelin-1-induced incorporation of cholesterol into rat adrenals. *Steroids* **61**: 317-322.

440. Pecci, A., Gomez-Sanchez, C.E., Padron, S. y Cozza, E.N. (1993). Effects of endothelin-1 in content and distribution of adrenal cholesterol in anesthetized rats. *Life Sci. Adv.* **12**: 17-20.

441. Kapas, S., Cameron, L.A., Puddefoot, J.R. y Hinson, J.P. (1996). Studies on endothelin receptors in the zonae fasciculata/reticularis of the rat adrenal cortex: contrast with the zona glomerulosa. *FEBS Lett.* **397**: 186-190.

442. Belloni, A.S., Rossi, G.P., Andreis, P.G., Neri, G., Albertin, G., Pessina, A.C. y Nussdorfer, G.G. (1996). Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension* **27**: 1153-1159.

443. Sone, M., Totsune, K., Takahashi, K., Ohneda, M., Itoi, K., Murakami, O., Miura, Y., Mouri, T. y Yoshinaga, K. (1991). Immunoreactive endothelin in pheochromocytomas. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 Suppl 7**: S427-9.

444. Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M. y Masaki, T. (1989). Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide? *Am. J. Physiol.* **256**: R858-66.

445. Imai, T., Hirata, Y., Eguchi, S., Kanno, K., Ohta, K., Emori, T., Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Masaki, T. y Marumo, F. (1992). Concomitant expression of receptor subtype and isopeptide of endothelin by human adrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 1115-1121.

446. Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M. y Masaki, T. (1989). Binding sites for endothelin-1 in rat tissues: an autoradiographic study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**: S153-S154

447. Belloni, A.S., Pacheco, Y.G., Markowska, A., Andreis, P.G., Meneghelli, V., Malendowicz, L.K. y Nussdorfer, G.G. (1997). Distribution and functional significance of the endothelin receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res.* **288**: 345-352.

448. Rebuffat, P., Mazzocchi, G., Macchi, C., Malendowicz, L.K., Gottardo, G. y Nussdorfer, G.G. (1999). Mechanisms and receptor subtypes involved in the stimulatory action of endothelin-1 on rat adrenal zona glomerulosa. *Int. J. Mol. Med.* **3**: 307-310.

449. Nussdorfer, G.G., Rossi, G.P. y Belloni, A.S. (1997). The role of endothelins in the paracrine control of the secretion and growth of the adrenal cortex. *Int. Rev. Cytol.* **171**: 267-308.

450. Pecci, A., Cozza, E.N., Devlin, M., Gomez-Sanchez, C.E. y Gomez-Sanchez, E.P. (1994). Endothelin-1 stimulation of aldosterone and zona glomerulosa ouabain- sensitive sodium/potassium-ATPase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **50**: 49-53.

451. Emori, T., Hirata, Y., Kanno, K., Ohta, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. y Marumo, F. (1991). Endothelin-3 stimulates production of endothelium-derived nitric oxide via phosphoinositide breakdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 228-235.

452. Hinson, J.P., Cameron, L.A., Puddefoot, J.R. y Kapas, S. (1997). Endothelin-1 acts through ETA receptors to stimulate aldosterone secretion by the rat adrenal gland. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 116S

453. Rossi, G.P., Albertin, G., Neri, G., Andreis, P.G., Hofmann, S., Pessina, A.C. y Nussdorfer, G.G. (1997). Endothelin-1 stimulates steroid secretion of human adrenocortical cells ex vivo via both ETA and ETB receptor subtypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 3445-3449.

454. Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Gottardo, G., Meneghelli, V. y Nussdorfer, G.G. (1996). Evidence that both ETA and ETB receptor subtypes are involved in the in vivo aldosterone secretagogue effect of endothelin-1 in rats. *Res. Exp. Med. (Berl.)* **196**: 145-152.

455. Malendowicz, L.K., Nowak, M., Paluszak, J. y Torlinska, T. (1987). Adrenocortical function in 4-APP treated rats: a coupled stereological and biochemical study. *J. Steroid Biochem.* **26**: 487-492.

456. Nagy, K., Koroknai, L. y Spat, A. (1984). Effect of lipoproteins on aldosterone production by isolated glomerulosa cells. *J. Steroid Biochem.* **20**: 789-791.

457. Chao, Y.S., Windler, E.E., Chen, G.C. y Havel, R.J. (1979). Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.* **254**: 11360-11366.

458. Nowak, M., Majchrzak, M. y Malendowicz, L.K. (1987). Stereologic studies on the adrenal cortex of 4-APP (4-amino- pyrazolopyrimidine)-induced lipoprotein-deficient rats. *Exp. Pathol.* **31**: 169-173.

459. Mazzocchi, G., Robba, C., Meneghelli, V. y Nussdorfer, G.G. (1986). Long term effects of the hypocholesterolaemic drug 4-aminopyrazolo- pyrimidine on the zona fasciculata of the rat adrenal cortex. *J. Anat.* **149:1-9**: 1-9.

460. Prack, M.M., Nicosia, M., Williams, D.L. y Gwynne, J. (1991). Relationship between apolipoprotein E mRNA expression and tissue cholesterol content in rat adrenal gland. *J. Lipid Res.* **32**: 1611-1618.

461. Campbell, D.J. (1982). Effect of rat plasma lipoproteins on aldosterone production by rat zona glomerulosa cells in vitro. *J. Steroid Biochem.* **17**: 709-711.

462. Mazzocchi, G., Robba, C., Meneghelli, V. y Nussdorfer, G.G. (1987). Effects of ACTH and aminoglutethimide administration on the morphological and functional responses of rat adrenal zona fasciculata to a prolonged treatment with 4-aminopyrazolo-pyrimidine. *J. Anat.* **154:55-61**: 55-61.

463. Hall, P.F. (1987). ACTH and corticosteroidogenesis. En: *Corticotropin (ACTH)* (Li, C.H., Ed.), pág. 89-125, Academic Press, Inc., Orlando.

464. Trudel, C., Couet, J., Martel, C., Labrie, C. y Labrie, F. (1991). Regulation of adrenal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase expression and activity by adrenocorticotropin and corticosterone in the rat. *Endocrinology* **129**: 2077-2084.

465. Lehoux, J.G., Lefebvre, A., Belisle, S. y Bellabarba, D. (1990). Effect of ACTH suppression on adrenal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in 4-aminopyrazolopyrimidine-treated rats. *Mol. Cell Endocrinol.* **69**: 41-49.

466. Lehoux, J.G. y Ducharme, L. (1993). Effects of dexamethasone on the levels of adrenal steroidogenic enzyme mRNA in rats treated with 4-aminopyrazolopyrimidine. *Mol. Cell Endocrinol.* **93**: 1-10.

467. Almeida, H., Magalhaes, M. y Magalhaes, M.C. (1987). Nucleolar alterations induced by 4-aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine in adrenal cortex and liver cells of rat. *Cell Tissue Res.* **248**: 231-234.

468. Charreau, E.H., Calvo, J.C., Nozu, K., Pignataro, O., Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1981). Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin-stimulated and -desensitized testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* **256**: 12719-12724.

469. Chapman, M.J. (1986). Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* **128**: 70-143.

470. Gotto, A.M.J., Pownall, H.J. y Havel, R.J. (1986). Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* **128**: 3-41.

471. Leitersdorf, E., Stein, O. y Stein, Y. (1985). Angiotensin II stimulates receptor-mediated uptake of LDL by bovine adrenal cortical cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* **835**: 183-190.

472. Koper, W.J., Cordle, S.R. y Yeaman, S.J. (1985). Effect of high and low density lipoproteins on corticotropin-mediated cortisol synthesis by bovine zona fasciculata cells. *J. Steroid Biochem.* **23**: 369-371.

473. Yaguchi, H., Tsutsumi, K., Shimono, K., Omura, M., Sasano, H. y Nishikawa, T. (1998). Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sci.* **62**: 1387-1395.

474. Rainey, W.E., Rodgers, R.J. y Mason, J.I. (1992). The role of bovine lipoproteins in the regulation of steroidogenesis and HMG-CoA reductase in bovine adrenocortical cells. *Steroids* **57**: 167-173.

475. Quarfordt, S.H. y Hilderman, H.L. (1970). Quantitation of the in vitro free cholesterol exchange of human red cells and lipoproteins. *J. Lipid Res.* **11**: 528-535.

476. Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47.

477. Glass, C., Pittman, R.C., Civen, M. y Steinberg, D. (1985). Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **260**: 744-750.

478. Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G., Halperin, G. y Stein, O. (1983). Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. *Biochim. Biophys. Acta* **752**: 98-105.

479. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. y Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**: 518-520.

480. Krieger, M. (1998). The "best" of cholesterols, the "worst" of cholesterols: a tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 4077-4080.

481. Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M. y Hobbs, H.H. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* **98**: 984-995.

482. Murao, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D. y Quehenberger, O. (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 17551-17557.

483. Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. y Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 12610-12615.

484. Glass, C., Pittman, R.C., Weinstein, D.B. y Steinberg, D. (1983). Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 5435-5439.

485. Brownie, A.C. y Pedersen, R.C. (1987). Effect of ACTH and other proopiomelanocortin-derived peptides on aldosterone secretion. En: *Corticotropin (ACTH)* (Li, C.H., Ed.), pág. 127-146, Academic Press, Inc., Orlando.

486. Stocco, D.M. (1999). An update on the mechanism of action of the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **107**: 229-235.

487. Wang, X., Liu, Z., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, A.M., Orly, J. y Stocco, D.M. (1998). Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer. *Endocrinology* **139**: 3903-3912.

488. Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., Urade, Y., Inui, T., Yamamura, T. y Okada, T. (1992). A potent and specific agonist, Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 953-959.

489. Shetty, S.S., Okada, T., Webb, R.L., DelGrande, D. y Lappe, R.W. (1993). Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**: 459-464.

490. Nussdorfer, G.G. y Mazzocchi, G. (1983). Long-term effects of ACTH on rat adrenocortical cells: a coupled stereological and enzymological study. *J. Steroid Biochem.* **19**: 1753-1756.

491. Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Rebuffat, P., Robba, C., Gottardo, G. y Nussdorfer, G.G. (1986). Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona glomerulosa of the rat. A coupled stereological and enzymological study. *Cell Tissue Res.* **243**: 303-310.

492. Pecci, A. Regulación de la respuesta adrenal: Acción y mecanismo de acción de adrenocorticotrofina y endotelina. 1994. Tesis. Universidad de Buenos Aires.

493. Devalle, J.J. y Lantos, C.P. (1971). An effect of ACTH on the metabolism of 1,2 3 H corticosterone by a cell free rat adrenal preparation. *Acta Physiol. Lat. Am.* **21**: 256-259.

494. Galigniana, M.D., Vicent, G.P., Burton, G. y Lantos, C.P. (1997). Features of the shuttle pair 11 beta-hydroxyprogesterone- 11- ketoprogesterone. *Steroids* **62**: 358-364.

495. Monder, C. y Shackleton, C.H. (1984). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? *Steroids* **44**: 383-417.

496. Nicholas, T.E. y Lugg, M.A. (1982). The physiological significance of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat lung. *J. Steroid Biochem.* **17**: 113-118.

497. Maser, E. y Bannenberg, G. (1994). The purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver microsomes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**: 257-263.

498. Latif, S.A., Sheff, M.F., Ribeiro, C.E. y Morris, D.J. (1997). Selective inhibition of sheep kidney 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase isoform 2 activity by 5 alpha- reduced (but not 5 beta) derivatives of adrenocorticosteroids. *Steroids* **62**: 230-237.

499. Brown, R.W., Chapman, K.E., Kotelevtsev, Y., Yau, J.L., Lindsay, R.S., Brett, L., Leckie, C., Murad, P., Lyons, V., Mullins, J.J., Edwards, C.R. y Seckl, J.R. (1996). Cloning and production of antisera to human placental 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem. J.* **313**: 1007-1017.

500. Diederich, S., Hanke, B., Oelkers, W. y Bahr, V. (1997). Metabolism of dexamethasone in the human kidney: Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 beta- reduction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 1598-1602.

501. Ferrari, P., Smith, R.E., Funder, J.W. y Krozowski, Z.S. (1996). Substrate and inhibitor specificity of the cloned human 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoform. *Am. J. Physiol.* **270**: E900-4.

502. Yang, K. y Matthews, S.G. (1995). Cellular localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene expression in the ovine adrenal gland. *Mol. Cell Endocrinol.* **111**: R19-23.

503. Li, K.X., Obeyesekere, V.R., Krozowski, Z.S. y Ferrari, P. (1997). Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Endocrinology* **138**: 2948-2952.

504. Lakshmi, V. y Monder, C. (1985). Extraction of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rat liver microsomes by detergents. *J. Steroid Biochem.* **22**: 331-340.

505. Lakshmi, V. y Monder, C. (1985). Evidence for independent 11-oxidase and 11-reductase activities of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: enzyme latency, phase transitions, and lipid requirements. *Endocrinology* **116**: 552-560.

506. New, M.I. y Levine, L.S. (1980). Hypertension of childhood with suppressed renin. *Endocr. Rev.* **1**: 421-430.

507. Takeda, Y., Miyamori, I., Yoneda, T., Iki, K., Hatakeyama, H., Blair, I.A., Hsieh, F.Y. y Takeda, R. (1994). Synthesis of corticosterone in the vascular wall. *Endocrinology* **135**: 2283-2286.

508. Yang, K. y Yu, M. (1994). Evidence for distinct isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine liver and kidney. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**: 245-250.

509. Funder, J.W., Pearce, P.T., Myles, K. y Roy, L.P. (1990). Apparent mineralocorticoid excess, pseudohypoaldosteronism, and urinary electrolyte excretion: toward a redefinition of mineralocorticoid action. *FASEB J.* **4**: 3234-3238.

510. Gomez-Sanchez, E.P., Ganjam, V., Chen, Y.J., Cox, D.L., Zhou, M.Y., Thanigaraj, S. y Gomez-Sanchez, C.E. (1997). The sheep kidney contains

a novel unidirectional, high affinity NADP(+)- dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta- HSD-3). *Steroids* **62**: 444-450.

511. Penning, T.M. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine. Rev.* **18**: 281-305.

512. Hughes, F.M.J. y Cidlowski, J.A. (1998). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis: protease-dependent activation of cell shrinkage and DNA degradation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**: 207-217.

513. Cidlowski, J.A., King, K.L., Evans-Storms, R.B., Montague, J.W., Bortner, C.D. y Hughes, F.M.J. (1996). The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent. Prog. Horm. Res.* **51:457-90; discussion 490-1**: 457-490.

514. Evans-Storms, R.B. y Cidlowski, J.A. (1995). Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 1-8.

515. Funkenstein, B., McCarthy, J.L., Dus, K.M., Simpson, E.R. y Waterman, M.R. (1983). Effect of adrenocorticotropin on steroid 21-hydroxylase synthesis and activity in cultured bovine adrenocortical cells. Increased synthesis in the absence of increased activity. *J. Biol. Chem.* **258**: 9398-9405.

516. Li, Z.G., Park, D. y LaBella, F.S. (1989). Adrenocorticotropin(1-10) and -(11-24) promote adrenal steroidogenesis by different mechanisms. *Endocrinology* **125**: 592-596.

517. Sayers, G., Seelig, S. y Kumar, S. (1975). Isolated adrenal cortex cells in suspension: stimulation and inhibition of steroidogenesis by analogues of ACTH. *J. Steroid Biochem.* **6**: 371-375.

518. Williams, A.C., Walker, B.R., Edwards, C.R.W., Burt, D., Williams, B.C., and Walker, S.W. (1992) *J.Endocrinol.* **132 (Suppl.)**, 111(Abstract)

519. Musajo, F., Neri, G., Tortorella, C., Mazzocchi, G. y Nussdorfer, G.G. (1996). Intra-adrenal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase plays a role in the regulation of corticosteroid secretion: an in vitro study in the rat. *Life Sci.* **59**: 1401-1406.

520. Sala, G.B., Hayashi, K., Catt, K.J. y Dufau, M.L. (1979). Adrenocorticotropin action in isolated adrenal cells. The intermediate role of cyclic AMP in stimulation of corticosterone synthesis. *J. Biol. Chem.* **254**: 3861-3865.

521. Farese, R.V., Fanjul, L.F., de Ruiz, G., Davis, J.S. y Cooper, D.R. (1987). ACTH increases diacylglycerol content and subcellular redistribution of protein kinase C in the rat adrenal in vivo. *Life Sci.* **41**: 2631-2637.

522. Bristow, A.F., Gleed, C., Fauchere, J.L., Schwyzer, R. y Schulster, D. (1980). Effects of ACTH (corticotropin) analogues on steroidogenesis and cyclic AMP in rat adrenocortical cells. Evidence for two different steroidogenically responsive receptors. *Biochem. J.* **186**: 599-603.

523. Igarashi, Y. y Kimura, T. (1984). Adrenocorticotropic hormone-mediated changes in rat adrenal mitochondrial phospholipids. *J. Biol. Chem.* **259**: 10745-10753.

524. Kimura, T. (1986). Transduction of ACTH signal from plasma membrane to mitochondria in adrenocortical steroidogenesis. Effects of peptide, phospholipid, and calcium. *J. Steroid Biochem.* **25**: 711-716.

525. Perchellet, J.P., Shanker, G. y Sharma, R. (1978). Regulatory role of guanosine 3',5'-monophosphate in adrenocorticotropin hormone-induced steroidogenesis. *Science* **199**: 311-312.

526. Pecci, A., Romero, D.G., Gomez-Sanchez, C.E., Lantos, C.P. y Cozza, E.N. (1996). Effects of staurosporine on ACTH-mediated stimulation of aldosterone production. *Cell Signal.* **8**: 381-386.

527. Cozza, E.N., Vila, M.C., Acevedo-Duncan, M., Farese, R.V. y Gomez-Sanchez, C.E. (1990). Treatment of primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells with adrenocorticotropin (ACTH) and phorbol esters: a comparative study of the effects on aldosterone production and ACTH signaling system. *Endocrinology* **126**: 2169-2176.

528. Cozza, E.N., Vila, M.C., Acevedo-Duncan, M., Gomez-Sanchez, C.E. y Farese, R.V. (1990). ACTH increases de novo synthesis of diacylglycerol and translocates protein kinase C in primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells. *J. Steroid Biochem.* **35**: 343-351.

529. Fakunding, J.L., Chow, R. y Catt, K.J. (1979). The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotropin, angiotensin II, and potassium in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology* **105**: 327-333.

530. Farese, R.V., Sabir, M.A. y Larson, R.E. (1980). On the mechanism whereby ACTH and cyclic AMP increase adrenal polyphosphoinositides. Rapid stimulation of the synthesis of phosphatidic acid and derivatives of CDP - diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **255**: 7232-7237.

531. Widmaier, E.P. y Hall, P.F. (1985). Protein kinase C in adrenal cells: possible role in regulation of steroid synthesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **43**: 181-188.

532. Wilson, J.X., Aguilera, G. y Catt, K.J. (1984). Inhibitory actions of calmodulin antagonists on steroidogenesis in zona glomerulosa cells. *Endocrinology* **115**: 1357-1363.

533. Schiffrin, E.L., Lis, M., Gutkowska, J. y Genest, J. (1981). Role of Ca2+ in response of adrenal glomerulosa cells to angiotensin II, ACTH, K+, and ouabain. *Am. J. Physiol.* **241**: E42-E46

534. Vilgrain, I., Cochet, C. y Chambaz, E.M. (1984). Hormonal regulation of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in bovine adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **259**: 3403-3406.

535. Rae, P.A., Gutmann, N.S., Tsao, J. y Schimmer, B.P. (1979). Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 1896-1900.

536. Dada, L.A., Paz, C., Mele, P., Solano, A.R., Cornejo, M.F. y Podesta, E.J. (1991). The cytosol as site of phosphorylation of the cyclic AMP-dependent protein kinase in adrenal steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**: 889-896.

537. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. y Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 397-402.

538. Schachtele, C., Seifert, R. y Osswald, H. (1988). Stimulus-dependent inhibition of platelet aggregation by the protein kinase C inhibitors polymyxin B, H-7 and staurosporine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**: 542-547.

539. Tischler, A.S., Ruzicka, L.A. y Perlman, R.L. (1990). Mimicry and inhibition of nerve growth factor effects: interactions of staurosporine, forskolin, and K252a in PC12 cells and normal rat chromaffin cells in vitro. *J. Neurochem.* **55**: 1159-1165.

540. Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H. y Miyamoto, E. (1991). Staurosporine: an effective inhibitor for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.* **56**: 294-298.

541. Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. y Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5- isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 5267-5272.

542. Geilen, C.C., Wieprecht, M., Wieder, T. y Reutter, W. (1992). A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl(amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *FEBS Lett.* **309**: 381-384.

543. Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E. y Loriolle, F. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**: 15771-15781.

544. Muid, R.E., Dale, M.M., Davis, P.D., Elliott, L.H., Hill, C.H., Kumar, H., Lawton, G., Twomey, B.M., Wadsworth, J. y Wilkinson, S.E. (1991). A novel conformationally restricted protein kinase C inhibitor, Ro 31- 8425, inhibits human neutrophil superoxide generation by soluble, particulate and post-receptor stimuli. *FEBS Lett.* **293**: 169-172.

545. Tang, P.M. y Chiang, J.Y. (1986). Modulation of reconstituted cholesterol 7 alpha-hydroxylase by phosphatase and protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**: 797-802.

546. Goodwin, C.D., Cooper, B.W. y Margolis, S. (1982). Rat liver cholesterol 7 alpha-hydroxylase. Modulation of enzyme activity by changes in phosphorylation state. *J. Biol. Chem.* **257**: 4469-4472.

547. Scallen, T.J. y Sanghvi, A. (1983). Regulation of three key enzymes in cholesterol metabolism by phosphorylation/dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 2477-2480.

548. Sanghvi, A., Grassi, E., Warty, V., Diven, W., Wight, C. y Lester, R. (1981). Reversible activation-inactivation of cholesterol 7alpha-hydroxylase possibly due to phosphorylation-dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**: 886-892.

549. Caron, M.G., Goldstein, S., Savard, K. y Marsh, J.M. (1975). Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J. Biol. Chem.* **250**: 5137-5143.

550. Lohr, J.B. y Kuhn-Velten, W.N. (1997). Protein phosphorylation changes ligand-binding efficiency of cytochrome P450c17 (CYP17) and accelerates its proteolytic degradation: putative relevance for hormonal regulation of CYP17 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 403-408.

551. Vilgrain, I., Defaye, G. y Chambaz, E.M. (1984). Adrenocortical cytochrome P-450 responsible for cholesterol side chain cleavage (P-450scc) is phosphorylated by the calcium-activated, phospholipid-sensitive protein kinase (protein kinase C). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 554-561.

552. Monnier, N., Defaye, G. y Chambaz, E.M. (1987). Phosphorylation of bovine adrenodoxin. Structural study and enzymatic activity. *Eur. J. Biochem.* **169**: 147-153.

553. Zhang, L.H., Rodriguez, H., Ohno, S. y Miller, W.L. (1995). Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 10619-10623.

554. Bellino, F.L. y Holben, L. (1989). Placental estrogen synthetase (aromatase): evidence for phosphatase- dependent inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 498-504.

555. Defaye, G., Monnier, N., Guidicelli, C. y Chambaz, E.M. (1982). Phosphorylation of purified mitochondrial cytochromes P-450 (cholesterol desmolase and 11 beta-hydroxylase) from bovine adrenal cortex. *Mol. Cell Endocrinol.* **27**: 157-168.

556. Lombardo, A., Laine, M., Defaye, G., Monnier, N., Guidicelli, C. y Chambaz, E.M. (1986). Molecular organization (topography) of cytochrome P-450(11)beta in mitochondrial membrane and phospholipid vesicles as studied by trypsinolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **863**: 71-81.

557. Downing, J.R. y Dimino, M.J. (1979). Studies on mitochondrial protein kinase activity of porcine corpora lutea. *Endocrinology* **105**: 570-573.

558. Hofmann, K., Kim, J.J. y Finn, F.M. (1978). The role of protein kinases in ACTH-stimulated steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**: 1136-1143.

559. Kreegipuu, A., Blom, N. y Brunak, S. (1999). PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic. Acids. Res.* **27**: 237-239.

560. Kennelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558.

561. Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. y Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic. Acids. Res.* **27**: 215-219.

562. Pinna, L.A. y Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**: 191-225.

563. Slight, S., Ganjam, V.K., Nonneman, D.J. y Weber, K.T. (1993). Glucocorticoid metabolism in the cardiac interstitium: 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase activity in cardiac fibroblasts. *J. Lab. Clin. Med.* **122**: 180-187.

564. Chavarri, M.R., Yamakita, N., Chiou, S. y Gomez-Sanchez, C.E. (1993). Calf adrenocortical fasciculata cells secrete aldosterone when placed in primary culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **45**: 493-500.

565. Cross, S.H. y Bird, A.P. (1995). CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 309-314.

566. Lewin, B. (1994). Chromosomes consist of nucleosomes. En: *Genes V* (Lewin, B., Ed.), pág. 797-843, Oxford University Press, Oxford.

567. Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic. Acids. Res.* **15**: 8125-8148.

568. Litter, M. (1998). Farmacología de las suprarrenales, hipófisis anterior y hormonas hipotalámicas. Corticosteroides. Hormonas de la adenohipófisis y afines. En: *Farmacología experimental y clínica* (Anónimopág. 1105-1164, El Ateneo, Buenos Aires.

569. Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.

570. Rossmann, M.G., Moras, D. y Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199.

571. Persson, B., Krook, M. y Jornvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**: 537-543.

572. Chen, Z., Jiang, J.C., Lin, Z.G., Lee, W.R., Baker, M.E. y Chang, S.H. (1993). Site-specific mutagenesis of Drosophila alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochemistry* **32**: 3342-3346.

573. Ghosh, D., Weeks, C.M., Grochulski, P., Duax, W.L., Erman, M., Rimsay, R.L. y Orr, J.C. (1991). Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 10064-10068.

574. Albiston, A.L., Smith, R.E., Obeyesekere, V.R. y Krozowski, Z.S. (1995). Cloning of the 11 beta HSD type II enzyme from human kidney. *Endocr. Res.* **21**: 399-409.

575. Agarwal, A.K., Mune, T., Monder, C. y White, P.C. (1995). Cloning of cDNA encoding an NAD(+)-dependent isoform of 11 beta- hydroxysteroid dehydrógenase in sheep kidney. *Endocr. Res.* **21**: 389-397.

576. Best, R., Nelson, S.M. y Walker, B.R. (1997). Dexamethasone and 11-dehydrodexamethasone as tools to investigate the isozymes of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vitro and in vivo. *J. Endocrinol.* **153**: 41-48.

577. Oelkers, W., Buchen, S., Diederich, S., Krain, J., Muhme, S. y Schoneshofer, M. (1994). Impaired renal 11 beta-oxidation of 9 alpha-fluorocortisol: an

explanation for its mineralocorticoid potency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 928-932.

578. Pepe, G.J., Davies, W.A., Dong, K.W., Luo, H. y Albrecht, E.D. (1999). Cloning of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD)-2 gene in the baboon: effects of estradiol on promoter activity of 11beta-HSD- 1 and -2 in placental JEG-3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**: 101-110.

579. Kyossev, Z., Walker, P.D. y Reeves, W.B. (1996). Immunolocalization of NAD-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human kidney and colon. *Kidney Int.* **49**: 271-281.

580. Suzuki, T., Sasano, H., Suzuki, S., Hirasawa, G., Takeyama, J., Muramatsu, Y., Date, F., Nagura, H. y Krozowski, Z.S. (1998). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human lung: possible regulator of mineralocorticoid action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 4022-4025.

581. Levy, H., Cha, C.H., Cargill, D.I. y Carlo, J.J. (1965). The inhibition of 11 beta-hydroxylation of deoxycorticosterone by metopirone in bovine adrenal perfusions (1). *Steroids* **5**: 147-162.

582. Levy, H., Cha, C.H. y Carlo, J.J. (1965). The inhibition by metopirone of 11beta- and 19- hydroxylations of 11-deoxycortisol in bovine adrenal perfusion. *Steroids* **5**: 469-478.

583. Suhara, K., Takeda, K. y Katagiri, M. (1986). P-45011 beta-dependent conversion of cortisol to cortisone, and 19- hydroxyandrostenedione to 19-oxoandrostenedione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 369-375.

ABREVIATURAS

11β-HSD	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
11β-HSD-1	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
11β-HSD-2	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
3β-HSD	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ-4-isomerasa
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACTH	Hormona adrenocorticotrofica
AE	Actividad específica
AII	Angiotensina II
AME	Exceso Aparente de Mineralocorticoides
ANP	Péptido atrial natriurético
BSA	Seroalbúmina bovina
BSA-FAF	Seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CRF	Factor liberador de corticotrofina
db-cAMP	Dibutiril cAMP
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOG	Dioctanoil[s,n]glicerol
DTT	Ditiotreitol
ECE	Enzima convertidora de endotelina
ES	Error Standard
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina-1
ET_A	Receptor de Endotelina subtipo A

ET_B	Receptor de Endotelina subtipo A
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	Hidroximetil glutaril coenzima A
LDL	Lipoproteína de baja densidad
NS	No significativo ($p>0.05$)
$P450_{scc}$	Citocromo P-450-escición de la cadena lateral del colesterol
PCR	Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	2,5-Difeniloxazol
RIA	Radioinmunoensayo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS
T/C	Tratado/Control