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

Influencia del estrés sobre la regulación de la actividad 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa renal

Zallocchi, Marisa Laura

2003

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:
Zallocchi, Marisa Laura. (2003). Influencia del estrés sobre la regulación de la actividad 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa renal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3632_Zallocchi.pdf

Cita tipo Chicago:
Zallocchi, Marisa Laura. "Influencia del estrés sobre la regulación de la actividad 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa renal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3632_Zallocchi.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

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA
LABORATORIO DE ESTEROIDES

INFLUENCIA DEL ESTRES SOBRE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA RENAL

Autor:

MARISA LAURA ZALLOCCHI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA DAMASCO

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

3632

-2003-

Universidad de Buenos Aires

Laboratorio de Esteroides
PRHOM-CONICET

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

LABORATORIO DE ESTEROIDES

REGULATION OF THE RENAL 11ß-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY BY STRESS

Author:

MARISA LAURA ZALLOCCHI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA DAMASCO

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

Universidad de Buenos Aires

-2003-

Laboratorio de Esteroides
PRHOM-CONICET

RESUMEN

Este trabajo pretende dilucidar algunos de los mecanismos mediados por el estrés y por los glucocorticoides, sobre la actividad de la 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11ßHSD2). Con este fin se obtuvieron los siguientes aportes:

La presencia de la glándula adrenal intacta permite que el animal responda, ante una situación de estrés, con un aumento en la actividad y abundancia de la 11ßHSD2 renal; produciéndose un aumento en el catabolismo de los glucocorticoides circulantes. En ausencia de la glándula adrenal, la respuesta del organismo difiere dependiendo de la situación de estrés ensayada. Para el caso de las ratas sometidas a una sobrecarga simulada, existe un incremento de la actividad y abundancia de la 11ßHSD2 renal, mientras que, los animales sometidos a una acidosis metabólica, sólo evidencian un incremento en la actividad enzimática con la administración de glucocorticoides. Este incremento se produce sin un aumento en la expresión de la enzima.

La administración aguda de corticosterona a ratas adrenalectomizadas, produjo un aumento progresivo de la actividad y abundancia enzimática, hasta la dosis fisiológica de 68 µg de corticosterona/100 g de peso corporal.

La administración crónica de glucocorticoides, sólo produjo un incremento en la actividad y abundancia de la 11ßHSD2, con la dosis suprafisiológica de 308 µg de corticosterona/100 g peso corporal.

Existe un incremento progresivo de la actividad enzimática a medida que aumentan los niveles de glucocorticoides circulantes, hasta una cierta concentración (concentración umbral) a partir de la cual la actividad enzimática se vuelve independiente de los niveles de corticosterona. Esta falta de correlación entre los niveles de corticosterona y la actividad enzimática, junto con el aumento de actividad observado en animales adrenalectomizados estresados llevó a plantear la posibilidad de la existencia de algún factor extra-adrenal involucrado en la regulación de la actividad de la 11ßHSD2.

La linea celular MDCK, derivada de riñón distal de perro posee actividad 11ß-deshidrogenasa. La serotonina, posible factor involucrado en la respuesta de la 11ßHSD2 frente al estrés, estimula la actividad 11ßHSD2 en esta línea celular. Esta estimulación depende de la concentración de serotonina utilizada y de la forma de administración. Además, serotonina muestra un efecto multifásico sobre la estimulación de la actividad enzimática. La acción de serotonina sobre las células MDCK, estaría mediada por receptores $5HT_{1D\alpha}$.

ABSTRACT

This work is focused on elucidation of some of the regulatory mechanisms of stress- and glucocorticoid-mediated renal 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11ßHSD2) activity. To this purpose the following contributions were obtained.

The presence of an intact adrenal gland allows the animal to increase renal 11ßHSD2 activity and abundance in response to stress, thereby stimulating glucocorticoid catabolism. In the absence of the adrenal gland the organism's response differs depending the stress situation applied: rats submitted to simulated gavage, increase renal 11ßHSD2 activity and abundance, while rats submitted to metabolic acidosis only show an increase in enzyme activity upon glucocorticoid administration. This increment occurs without an increase in enzyme abundance.

The acute administration of corticosterone to adrenalectomized rats produces a progressive increment in enzyme activity and abundance, up to the physiological dose of 68 µg corticosterone/100 g body weight.

The chronic administration of corticosterone, only produces an increment in enzyme activity and abundance with the supraphysiological dose of 308 µg corticosterone/100 g body weight.

The cell line MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), derived from distal nephron, shows 11ßHSD activity. Serotonin, believed to be the extra-adrenal factor involved in 11ßHSD2 regulation in adrenalectomized rats, stimulates its activity. Besides, serotonin shows a multiphasic effect on dehydrogenase activity stimulation. Serotonin action in MDCK cells, is probably due to $5HT_{1D\alpha}$ receptor activation.

a Klim y a Rubén

Deseo expresar mi agradecimiento,

al Dr. Carlos Lantos por haberme dado la oportunidad, siendo aún alumna, de trabajar en su laboratorio y por haber aceptado ser mi Director de Beca, sin la cual no habría podido realizar esta Tesis Doctoral.

a la Dra. Cristina Damasco por haber aceptado ser mi Directora de Tesis.

al Dr. Juan Carlos Calvo, sin cuya ayuda muchos de los experimentos realizados para esta Tesis, no habrían podido llevarse a cabo, y por no haber tenido ningún reparo en aclarar la infinidad de dudas que le fui planteando a lo largo de estos cuatro años.

a toda la gente del Laboratorio de Esteroides.

a Pilar, por haber sido mi compañera de trabajo en los primeros años.

a Laura por haber sido mi compañera de mesada en estos tres años. Por haber compartido conmigo todo el trabajo existente en el Laboratorio, desde el cuidado de las células, pasando por los secretos del HPLC (donde golpearlo para que funcione) hasta la realización de muchos gráficos de esta Tesis. Además, ahora que voy a ser Doctora espero que me de la oportunidad de poder dirigirla.

a Adali, por haberme aclarado muchas de mis dudas existenciales (como por ejemplo: dónde están las llaves, dónde está ella, dónde están los datos, etc.); por haberme enseñado cocina (buen uso de la olla a presión), artesanías (mal uso de la olla a presión), por haberme mantenido al tanto de todos los chismes de la Universidad y por haberme enseñado que a pesar de que la entropía del Universo crece constantemente siempre se pueden lograr buenas cosas.

al grupo de Adali. A Luciana por todas las veces que la hinché; a Esteban por enseñarme que las personas no cambian por un simple cambio en su color o corte de pelo, por demostrar que las soluciones no se pierden sino que cambian de lugar (en general siempre es vectorial hacia su laboratorio), por haberme otorgado el privilegio de preparar el Bradford para todo el Laboratorio. A Ale que me enseñó que no hay que fijarse cómo combina uno, la comida total todo va a parar al mismo lugar; a Leo y a Diego, a quienes recién comienzo a conocer, parecen personas organizadas, lamentablemente se irán desorganizando con el tiempo a medida que aumente la interacción con Adali (relación directamente proporcional).

a Sandra, por ser una excelente persona que, metódicamente, está presente todos los días de la semana a pesar de no cobrar un solo peso y por compartir los últimos experimentos conmigo.

a Damián, quien no tuvo reparos en ayudarme en el poco tiempo que coincidimos en este Laboratorio. Al Dr. Eduardo Cozza, quien, sin saberlo (o quizá inconscientemente siempre lo supo), donó algunos de los reactivos para muchos de mis experimentos.

a Beba por su asistencia técnica y su amistad; y a quién extraño mucho.

a Norma, porque es la persona que más vida le da a este pasillo. Qué sería de nuestras vidas sin sus gritos! Por solucionarnos todos los problemas cotidianos que nos acosan y sobre todo por su bondad.

a María, por las veces que me ayudo con los animales, por su "buen humor" y por no tener problemas en decir lo que piensa.

a Nora, por sorprenderme con todo lo que sabe, sobre cualquier cosa que uno le pregunte y por no haberme colgado como una gallina degollada a pesar de mis maldades.

a Guillermo, por ser un excelente compañero en la docencia, por ayudarme desinteresadamente en todo lo que pudo, por todas esas horas que me permitía irme antes del turno para que pueda finalizar mis experimentos, en fin por ser tan buena persona.

a Abel y a Paula, por su compañerismo en las materias que me tocó compartir con ellos y por los momentos tan divertidos que he pasado con las salidas de Paula.

a la gente del Laboratorio de Biología Celular, el Dr. Julio Azcurra, Mariana, Mariano y Soledad; por permitirnos utilizar sus centrífugas y el espacio que tienen destinado al mantenimiento de los animales.

A Víctor por enseñarme a no ser tan estructurada al colocar el manómetro en el tubo de nitrógeno y por tomarse el trabajo de alicuotar los militros de BSA de a 10 µl.

a Cecilia Varone, por escucharme y ayudarme en todo lo que pudo y puede.

a la Dra. Evi Wider, por comprarnos el café y por prenderse en todas nuestras bromas y por aprender a perder las llaves y formar, así, parte de nuestro grupo.

a la Dra. Elena Llambías, porque nunca tuvo problemas en prestarnos el microscopio de Grinstein.

nuevamente al Dr. Lantos, por todos sus buenos consejos y sus brillantes ideas que dieron origen a gran parte de esta Tesis, por sobretodo a la idea del posible nuevo circuito de regulación existente entre los glucocorticoides y las bioaminas.

a toda la gente que me cruzo constantemente en este pasillo y a la que no, María del Cármen Ríos, Mary Tomio, Liliana Guerra, María del Cármen Vila, Claudia, Rosa Waisntok, Cármen, Andrea Pozzi, Paula.

al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por haberme permitido utilizar su contador de centelleo en la época en que no contábamos con uno en el Departamento.

al Departamento de Química Biológica y al Laboratorio de Esteroides, por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

a la Universidad de Buenos Aires por la beca otorgada que permitió mi subsistencia.

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

A Luis, Martín y Liliana.

especialmente y nuevamente, al Dr. Lantos, a Juan Carlos, a Adalí y a Laura, por haberse tomado el trabajo, sin ninguna obligación salvo la amistad, de haber leído esta Tesis Doctoral.

A mi familia, por haberme acompañado y apoyado durante esta estapa de mi carrera.

INDICE

1 INTRODUCCIÓN.....2

1.1. FUNCION Y REGULACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL.....2

1.1.1. Generalidades.....2

1.1.2. Características anátomo-funcionales de la glándula adrenal.....4

Control parácrino de la funciones adrenocorticales y adrenomedulares.....6

Inervación de la glándula adrenal.....6

Sistema vascular de la glándula adrenal.....7

1.1.3. Regulación de la secreción de glucocorticoides.....8

Acción de ACTH sobre la corteza adrenal.....9

1.1.4. Regulación de la secreción de mineralocorticoides.....9

Sistema Renina-Angiotensina.....10

El ión potasio.....12

Factores pituitarios.....12

El ión sodio.....13

Otros agentes estimulatorios.....13

Agentes inhibitorios.....14

1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN Y SELECTIVIDAD DE LAS HORMONAS CORTICOIDES.....15

1.2.1. Generalidades.....15

1.2.2. Los glucocorticoides y los mineralocorticoides.....19

Los glucocorticoides.....19

Los mineralocorticoides.....22

Efectos no-genómicos (rápidos) de los corticoides.....23

1.2.3. Mecanismos generales de los efectos corticoides.....24

Metabolismo de los carbohidratos y las proteínas.....24

Metabolismo de los lípidos.....25

Balance electrolítico y de fluidos.....25

Regulación del sistema cardiovascular.....27

Músculo esquelético y tejido conectivo....28
Sistema nervioso central....29
Acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras....29
1.2.4. Aspectos moleculares y celulares de la selectividad mineralocorticoidea: MR, GR y 11ßHSD2....29
1.3. EL RIÑÓN DE MAMÍFEROS....32
1.3.1. Anatomía del riñón....32
1.3.2. El nefrón....33
El glomérulo y la cápsula de Bowman....34
El túbulo proximal....35
El asa de Henle....36
El túbulo contorneado distal....37
Túbulo colector....37
El aparato yuxtaglomerular....38
1.4. LAS 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS....40
1.4.1. Descubrimiento de las 11ßHSDs....41
1.4.2. La 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1....43
Generalidades....43
Expresión....44
Rol fisiológico de la 11ßHSD1 y regulación....45
Rol fisiológico....45
Regulación....46
Evidencias de su acción amplificadora....47
Hígado....47
Cerebro....47
Glándula adrenal....48
11ßHSD1 y su relación con ciertas enfermedades....48
Deficiencia aparente en la reducción de cortisona....48
Obesidad....49
1.4.3. La 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2....49

Generalidades.....49
Expresión y rol fisiológico.....51
Regulación.....52
El sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides y la hipertensión inducida por intoxicación con regaliz.....54
Sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides tipo I y II.....54
Hipertensión producida por regaliz.....59
11βHSD2 y su relación con la hipertensión esencial.....60
11βHSD2 y su relación con ciertas enfermedades.....61
Sindrome ACTH ectópico.....61
Cáncer.....61
1.4.4. Estructura genética y proteica de las hidroxiesteroides deshidrogenasas.....61
1.5. ESTRÉS.....65
1.5.1. Historia: el concepto de estrés.....65
1.5.2. Aspectos fisiológicos del estrés.....67
Sistemas involucrados en el estrés.....68
Efectos del estrés agudo.....69
Efectos del estrés crónico.....70
1.5.3. En resumen.....71
1.6. LA SEROTONINA.....73
1.6.1. Síntesis y metabolismo.....73
1.6.2. Múltiples receptores para 5HT.....76
1.6.3. Sitios de acción de 5HT.....77
Células enterocromafines.....77
Plaquetas.....77
Sistema cardiovascular.....77
Riñón.....78
Glándula drenal.....78
Sistema nervioso central.....79

1.6.4. Regulación de las funciones serotoninérgicas por las hormonas adrenales y viceversa....80
2 OBJETIVOS....82
3 DISEÑO EXPERIMENTAL....85
3.1. MATERIALES....86
3.1.1. Reactivos....86
3.1.2. Equipamiento....86
3.2. METODOS....88
3.2.1. Tratamiento de los distintos grupos de animales....88
a) Generación de estrés agudo en animales intactos....88
b) Generación de estrés agudo en animales adrenalectomizados....89
c) Administración aguda de corticosterona a animales adrenalectomizados....90
d) Administración crónica de corticosterona a animales adrenalectomizados....91
3.2.2. Medición de los parámetros sanguíneos en animales acidóticos....91
3.2.3. Preparación de la fuente enzimática....92
3.2.4. Estudios cinéticos con microsomas renales. Metodología estándar de trabajo....92
3.2.5. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 con microsomas renales....93
3.2.6. Estudios de abundancia de la isoforma 11ßHSD2. Metodología estándar de trabajo....94
3.2.7. Determinación cuantitativa de corticosterona por radioinmunoensayo....95
3.2.8. Mantenimiento de la línea celular....96
3.2.9. Medición de la actividad 11ßhidroxiesteroide deshidrogenasa en células MDCK. Metodología estándar de trabajo....97
a) Estudios cinéticos....97

b) Estudios de actividad a punto único.....98
c) Estudios de inhibición de la actividad enzimática.....99
3.2.10. Efecto de serotonina sobre la actividad 11ßhidroxiesteroide deshidrogenasa en células MDCK.....100
a) Efecto de serotonina en presencia de corticosterona 1 µM.....100
b) Efecto de serotonina en presencia de corticosterona 10 nM.....100
3.2.11. Acción de distintos antagonistas sobre la estimulación de la actividad 11ßhidroxiesteroide deshidrogenasa mediada por serotonina.....100
3.2.12. Aislamiento de los esteroides por HPLC.....101
3.2.13. Cuantificación de los esteroides por HPLC.....103
3.2.14. Análisis estadístico.....104
3.3. CONDICIONES DE INCUBACIÓN: Descripción y Resultados.....105
3.3.1 Condiciones óptimas para la medición de la actividad 11ßHSD2 con microsomas renales.....105
3.3.2 Condiciones óptimas para la medición de la expresión de la 11ßHSD2 con microsomas renales.....107
3.3.3 Condiciones óptimas para la medición de la actividad 11ßHSD en células MDCK.....109
a) Estudios de actividad en homogenatos de células MDCK.....110
b) Estudios de actividad en función del tiempo en células intactas.....112
3.3.4. Condiciones óptimas para la medición de la actividad 11ßHSD en células MDCK bajo condiciones no saturantes.....114
3.3.5. Controles realizados sobre el sistema de incubación con células MDCK.....116
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....118
Sección 4:REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD2 RENAL

ANTE DIVERSAS SITUACIONES DE ESTRÉS AGUDO.....119

4.1. ESTUDIOS CON ANIMALES INTACTOS SOMETIDOS A ESTRÉS.....121

4.1.1. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales intactos.....121

4.1.2. Medición de corticosterona plasmática como indicador de estrés.....122

4.1.3. Expresión de la enzima 11ßHSD2 en animales intactos.....122

4.2. ESTUDIOS CON ANIMALES ADRENALECTOMIZADOS (ADX) SOMETIDOS A ESTRÉS.....124

4.2.1. Estudios cinéticos.....125

4.2.2. Niveles de corticosterona plasmática.....127

4.2.3. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales ADX.....129

4.2.4. Expresión de la enzima 11ßHSD2 en animales ADX.....130

4.3. DISCUSIÓN.....131

Sección 5: REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD2 RENAL POR GLUCOCORTICOIDES.....138

5.1. REGULACIÓN DE LA 11ßHSD2 EN ANIMALES ADX INYECTADOS, EN FORMA AGUDA, CON DOSIS CRECIENTES DE CORTICOSTERONA.....138

5.1.1. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales ADX inyectados en forma aguda con corticosterona.....138

5.1.2. Niveles de corticosterona plasmática en los ADX inyectados en forma aguda.....139

5.1.3. Expresión de la 11ßHSD2.....141

5.2. REGULACIÓN DE LA 11ßHSD2 EN ANIMALES ADX INYECTADOS, EN FORMA CRÓNICA, CON DOSIS CRECIENTES DE CORTICOSTERONA.....142

5.2.1. Estudios cinéticos en animales ADX inyectados en forma crónica con corticosterona.....142

5.2.2. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales ADX inyectados en forma crónica con corticosterona.....144
5.2.3. Niveles de corticosterona plasmática.....145
5.2.4. Expresión de la enzima 11ßHSD2 en animales ADX inyectados crónicamente.....146
5.3. DISCUSIÓN.....148
Sección 6: REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA POR SEROTONINA.....153
6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA PRESENTE EN CÉLULAS MDCK.....154
6.1.1. Estudios cinéticos.....154
6.1.2. Estudios de inhibición.....155
6.2. ESTUDIOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA POR SEROTONINA.....156
6.2.1. Estudios a concentraciones saturantes de sustrato.....156
6.2.2. Estudios a concentraciones subsaturantes de sustrato.....158
6.2.3. Efecto de serotonina en función de la concentración de sustrato.....165
6.2.4. Acción de distintos antagonistas sobre la estimulación de la actividad 11ßHSD mediada por serotonina.....167
6.3. DISCUSIÓN.....169
7 CONCLUSIONES.....176
8 REFERENCIAS.....182

A	Adenina
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADP	Adenosina difosfato
ADN	Acido dexosiribonucleico
AF-1	Función de activación de la transcripción independiente de ligando
AF-2	Función de activación de la transcripción dependiente de ligando
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
AIII	Angiotensina III
AME	Aparente exceso de mineralocorticoides
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANP	Péptido natriurético atrial
AP-1	Factor de transcripción heterodimérico formado por Jun y Fos
AVP	Arginina-vasopresina
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
Ca^2	Ión calcio
CBG	Globulina unidora de cortioides
cDNA	Acido dexosiribonucleico, copia
Cl_2Mg	Cloruro de magnesio
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
DHEA	Dehidroepiadronsterona
DMEN	Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium
dpm	Decaimientos por minuto
EDRF	Factor relajante derivado de endotelio
EDTA	Etilendiamin tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ENaC	Canal epitelial de sodio
ES	Error estándar
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
ß-END	Beta-endorfina
g	gramos
G	Guanina
GALFs	Factores similares al ácido gliciretínico

GATA-1	Factor de transcripción específico para secuencia GATA
GH	Hormona de crecimiento
GR	Receptor para glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
H^+-ATPasa	Bomba protón adenosin-trifosfatasa
HCl	Acido clorhídrico
HHA	Hipotálamo-hipófiso-adrenal
5-HIAA	Cromatografía líquida de alta presión
HPLC	Acido 5-hidroxindol acético
HRE	Elemento de respuesta a hormonas
11ßHSD	11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa
11ßHSD1	11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1
11ßHSD2	11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
HSP	Proteína activable por shock de calor
5HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTOL	5-hidroxitriptofol
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50
IGF-I	Factor de crecimiento similar a Insulina, tipo I
IL	Interleuquina
K^+	Ión potasio
Kb	kilobases
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodaltons
Km	Constante de Michaelis-Menten
LLC-PK_1	Células derivadas de epitelio renal de cerdo
ß-LPH	Hormona lipotropina beta
M	Molar
MAO	Monoamina oxidasa
MAPK	Proteína quinasa activable por mitógenos
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
mg	Miligramo
Mg^{2+}	Ión magnesio
Ml	Mililitro
µl	Microlitro

mM	Milimolar
μM	Micromolar
MR	Receptor para mineralocorticoides
mRNA	Acido ribonucleico, mensajero
α-MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos alfa
ß-MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos beta
γ-MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos gama
N_2	Nitrógeno molecular
Na^+	Ión sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD+	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADP(H)	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
Na^+/K^+-ATPasa	Bomba sodio/potasio-adenosin trifosfatasa
NF-κB	Factor de transcripción nuclear
NHE2	Intercambiador sodio-protón, isoforma 2
NHE3	Intercambiador sodio-protón, isoforma 3
nGRE	Elemento de respuesta negativa a glucocorticoides
nM	Nanomolar
NPY	Neuropéptido Y
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino conteniendo Tween 20
PEPCK	Fosfoenol piruvato carbosiquinasa
pg	Picogramos
pH	-log(concentración de protones)
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína quinasa dependiente de Calcio
POMC	Pro-opiomelanocortina
R	Base purina
SAM	Sistema Simpático-Adrenomedular
SCAD	Alcohol deshidrogenasas de cadena corta
SDR	Deshidrogenasas/reductasas de cadena corta

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS
SNC	Sistema nervioso central
T	Timidina
TH	Tritofano hidroxilasa
THE	Tetrahidrocortisona
THF	Tetrahidrocortisol
5α-THF	5alfa-tetrahidrocortisol
TLC	Cromatografiá en capa delgada
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
Vmax	Velocidad máxima
Y	Base pirimidínica

Introducción

1.1. FUNCION Y REGULACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL

1.1.1. GENERALIDADES

La glándula adrenal de mamíferos está formada por dos estructuras endócrinas de diferente origen embriológico: una corteza externa, derivada del mesodermo que sintetiza distintas hormonas a partir del colesterol y una médula interna, derivada del neuroectodermo, que sintetiza, principalmente, catecolaminas (Figura 1.1.1.). Ambas estructuras se encuentran cubiertas por una misma cápsula de tejido conectivo [1-5].

La corteza está constituida por células que sintetizan y secretan hormonas esteroideas al torrente sanguíneo. Por observación al microscopio óptico se pueden distinguir claramente tres zonas concéntricas dentro de la corteza: la zona glomerulosa, la zona fasciculata y la zona reticularis [2-4;6;7].

La médula adrenal está compuesta por células cromafines que sintetizan, almacenan y secretan, principalmente, a las catecolaminas epinefrina y norepinefrina. La concentración de catecolaminas es tan elevada que conduce a una reacción cromafin, en donde las células aparecen con un color marrón cuando son expuestas a dicromato de potasio, de ahí el origen de su nombre [2;3;6].

En mamíferos, la glándula adrenal posee una estructura piramidal y se encuentra ubicada arriba de cada riñón mientras que en otras especies su ubicación es paravertebral.

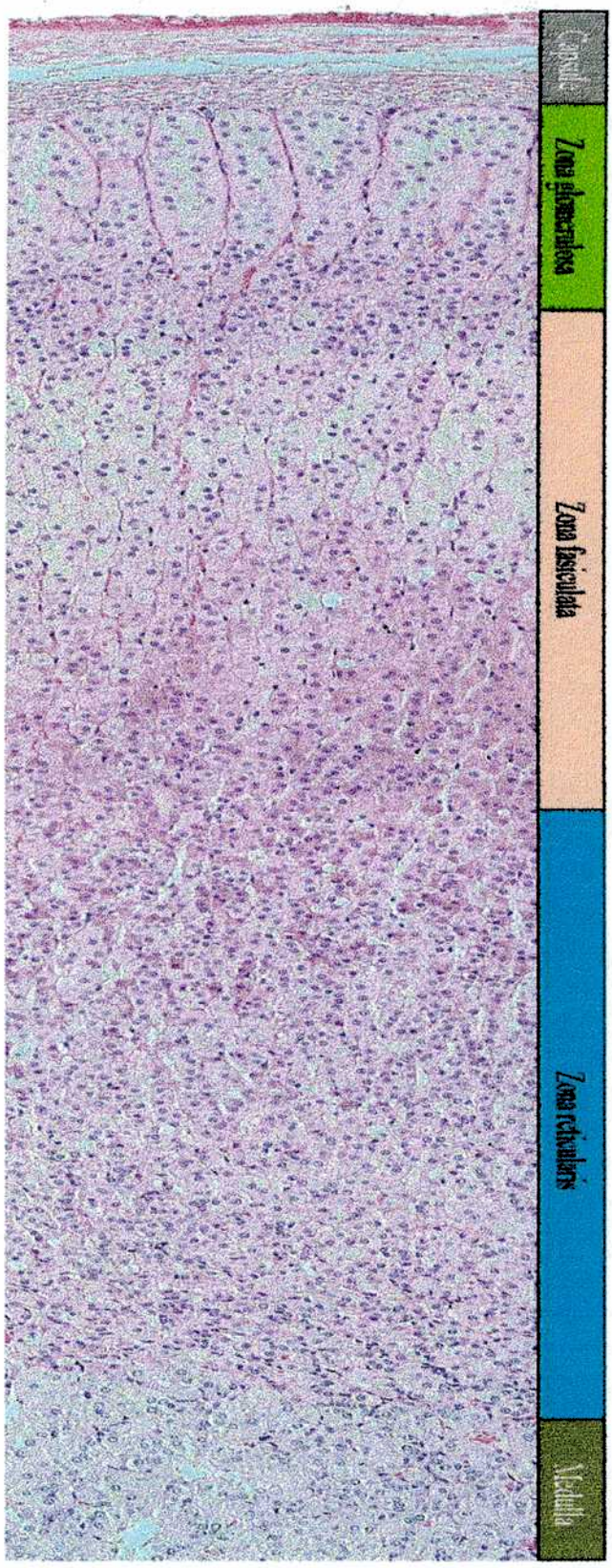


Figura 1.1.1 *Sección de glándula adrenal de gato.* (tinción con hematoxilina-eosina, *extraído de arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/ adrenal/histo_bigpic.html).*

El mantenimiento del tamaño y la función normal de la adrenal involucra la división celular en la zona glomerulosa y la subsecuente migración centrípeta y diferenciación celular en fasciculata y reticularis [2;3].

Entre los factores que regulan el crecimiento de la adrenal en el adulto se encuentran, el fragmento N-terminal de la pro-opiomelanocortina (POMC, pro-opiomelanocortin), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, fibroblast growth factor), el factor de crecimiento tipo I similar a la insulina (IGF-I, insulin-like growth factor I), la hormona de crecimiento (GH, growth hormone) y la hormona adrenocorticotrófica (ACTH, adrenocorticotropic hormone), principal hormona inductora de la síntesis de glucocorticoides.

La estimulación crónica con ACTH y la consecuente exposición a elevados niveles de glucocorticoides produce transformaciones del fenotipo de las células de la zona glomerulosa a células de la zona fasciculata, tanto en términos estructurales como funcionales [2].

1.1.2. CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-FUNCIONALES DE LA GLÁNDULA ADRENAL

De las tres zonas que forman parte de la corteza, la zona glomerulosa constituye el 15%, se encuentra inmediatamente adyacente a la cápsula y consiste en grupos de células con núcleo redondeado y algunos lípidos. La zona glomerulosa puede ser penetrada por extensiones de la zona fasciculata que accede a la cápsula [2;3;7].

La zona fasciculata constituye el 75% de la corteza, presenta células con arreglo en forma de cordones longitudinales, de una o dos células de grosor, separados de los cordones adyacentes por capilares. Estas células son mucho más grandes que las células de las otras dos zonas, y su citoplasma esta ocupado por numerosas gotas de lípidos [2;3;7].

La región más interna es la denominada zona reticularis y se encuentra constituida por cordones de células con un arreglo irregular, formando una disposición tipo red [2;3;7].

En la glándula adrenal madura la zona glomerulosa y la región más externa de la zona fasciculata sintetizan las hormonas mineralocorticoides, aldosterona y 11-desoxicorticosterona [2-4;6;8-10].

La zona fasciculata y, en menor importancia, la zona reticularis sintetizan y secretan, principalmente, a las hormonas glucocorticoides: cortisol y corticosterona [4;6;8;9]. También sintetizan y secretan andrógenos (predominantemente dehidroepiandrosterona [DHEA] y DHEA sulfato en humanos), los cuales son relativamente más abundantes en la zona reticularis. La sulfatación de DHEA ocurre exclusivamente en la zona reticularis [4;6;8].

Se ha observado, también síntesis y secreción de estrógenos en ambas zonas [8].

Tanto los glucocorticoides como los mineralocorticoides se encuentran muy conservados a través de la evolución de los vertebrados y ejercen su influencia sobre una gran cantidad de procesos biológicos básicos [2;11].

La médula se encuentra compuesta por células cromafines arregladas en cordones epiteliales, rodeados por finas capas de tejido conectivo, con numerosos nervios y vasos sanguíneos. Estas células, además de la síntesis y secreción de catecolaminas, sintetizan y almacenan neuropéptidos, neurotransmisores y proteínas, los cuales son liberados junto con las catecolaminas [2-4;12].

Hay dos tipos principales de vesículas cromafines: 1) vesículas grandes, redondas o alargadas, que contienen epinefrina y 2) vesículas pequeñas de alta densidad conteniendo norepinefrina [13].

El control integral de las funciones adrenales involucra interacciones cortico-medulares, un buen sistema de irrigación sanguínea, un sistema de inervación, al sistema inmune, factores de crecimiento y a los sistemas intraglandulares renina-angiotensina y CRH/ACTH (CRH, corticotropic releasing hormone). Además de

regular directamente las funciones adrenales, estos sistemas se influencian unos a otros, formando un circuito regulatorio intra-adrenal muy complejo [4;12;14].

Control parácrino de la funciones adrenocorticales y adrenomedulares

Los sistemas adrenocortical y adrenomedular, se encuentran íntimamente ligados tanto anatómica como funcionalmente, produciéndose interacciones parácrinas dentro de la adrenal. Varios productos adrenomedulares, como las catecolaminas, serotonina, y una gran cantidad de neuropéptidos (péptido vasoactivo intestinal - VIP, sustancia P, adrenomedulina, neuropéptido Y -NPY, péptido natriurético atrial - ANP, somatostatina); se encuentran involucrados en la regulación de la esteroidogénesis adrenocortical [2-4;12;15-20].

A su vez, las hormonas esteroideas liberadas por la corteza, influencian la expresión de neuropéptidos, proteínas y catecolaminas en las células cromafines medulares [4;15;16]. Por ejemplo, los glucocorticoides son necesarios para la supervivencia y el mantenimiento de las células cromafines y su producción de epinefrina (inducen la expresión de la enzima que convierte norepinefrina en epinefrina); así como para la organogénesis medular (ayudan a la diferenciación celular) [4;13;21]. La presencia de las dos isoformas de la 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11ßHSD) en la glándula adrenal (*ver punto 1.4. de la Introducción*), sugiere la existencia de una regulación fina sobre los niveles locales de glucocorticoides activos y en consecuencia, sobre la secreción de norepinefrina por la médula adrenal [1].

Queda claro que, cada componente de ambos sistemas (corteza y médula) actúa en forma individual y/o en forma coordinada afectando la respuesta fisiológica del organismo frente a variaciones del medio interno debidas a diferentes estímulos, entre ellos el estrés (*ver punto 1.5. de la Introducción)* [1;4].

Inervación de la glándula adrenal

Tradicionalmente, se consideró que sólo la médula adrenal poseía inervación, pero recientemente numerosos estudios han demostrado que la corteza adrenal es

inervada por dos tipos de nervios: 1) los que poseen sus cuerpos celulares fuera de la glándula y penetran la cápsula hacia la zona glomerulosa; y 2) los que poseen sus cuerpos celulares localizados en la médula adrenal, constituyendo una fuente intrínseca de inervación cortical.

Estudios inmunohistoquímicos han mostrado la presencia de catecolaminas, tirosina-hidroxilasa y dopamina-ß-hidroxilasa en las terminaciones nerviosas adrenocorticales [3;4;22]. Los neurotransmisores identificados en estas terminaciones ejercen efectos directos en el crecimiento glandular y en la esteroidogénesis, y modulan la acción de los estímulos humorales sobre la corteza adrenal. Estas inervaciones también tienen un papel importante en la regulación del tono vascular glandular [4].

La glándula adrenal es inervada por fibras colinérgicas preganglionares del sistema simpático que atraviesan la corteza adrenal. La estimulación de estas fibras neuronales permite la regulación de la síntesis y secreción de catecolaminas por las células cromafines, y un aumento de los niveles de determinados neuropéptidos como el VIP, NPY y CRH [3;4].

Sistema vascular de la glándula adrenal

La adrenal es un tejido altamente vascularizado. Existe una red de arteriolas ubicadas en el tejido conectivo que forma parte de la cápsula, es el plexus arteriolar subcapsular; a partir del cual parten vasos sanguíneos hacia la corteza y la médula [3;4;22].

Entre los factores que regulan el flujo sanguíneo, se encuentra ACTH que produce un aumento del flujo sanguíneo adrenal, a través de la liberación de histamina y serotonina por los mastocitos ubicados en la cápsula adrenal [3;4]. Algunos productos secretorios del endotelio vascular como el óxido nítrico, endotelina-1 y adrenomedulina, también se encuentran involucrados en la regulación local del flujo sanguíneo adrenal [4].

1.1.3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides, denominación que se refiere a sus efectos sobre el metabolismo de la carbohidratos, regulan una gran variedad de procesos metabólicos y homeostáticos, y median la respuesta frente a situaciones de estrés. Su secreción está regulada por la interacción hormonal entre hipotálamo, hipófisis y glándula adrenal (HHA, Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal), y también, por estímulos neurales. El ritmo circadiano o los estímulos neurológicos provenientes del cerebro y generados, por ejemplo, en respuesta al estrés, producen la liberación de CRH, de arginina-vasopresina (AVP) y de otros agentes, hacia la sangre portal del sistema hipotálamico-hipofisario.. En la hipófisis, CRH estimula la síntesis y secreción de ACTH hacia el torrente sanguíneo, mientras que AVP potencia los efectos de CRH [2;3;23;24].

En la corteza adrenal ACTH actúa induciendo la síntesis y secreción de glucocorticoides y de otros esteroides como los andrógenos y los mineralocorticoides [2;4;6;23].

Niveles elevados de glucocorticoides circulantes (sindrome de Cushing) así como su deficiencia (enfermedad de Addison) producen efectos nocivos sobre muchos tejidos, razón por la cual la secreción de estas hormonas se encuentra rigurosamente controlada por el balance generado entre la estimulación del eje HHA y la retroalimentación negativa ejercida por los mismos glucocorticoides [23]. Esta acción negativa de los glucocorticoides se ejerce, directamente, sobre la síntesis y la secreción de CRH, AVP y ACTH en hipotálamo e hipófisis respectivamente e, indirectamente, a través de otras regiones cerebrales [2-4;6;23;25-27]. La isoforma 1 de la enzima 11ßHSD (11ßHSD1), estaría involucrada en la amplificación de esta retroalimentación negativa (*ver punto 1.4. de la Introducción*) [23].

La síntesis y secreción de los glucocorticoides, también se encuentra regulada por factores intra-adrenales. Por ejemplo, las catecolaminas y algunos neuropéptidos (entre ellos NPY, leptina y orexinas), inducen de manera parácrina la secreción de glucocorticoides [2;3;13;20;28]. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de un sistema CRH/ACTH intra-adrenal, el cual intervendría en la modulación de la secreción de glucocorticoides [4].

Acción de ACTH sobre la corteza adrenal

ACTH se sintetiza como parte del POMC, molécula que sufre procesamiento postraduccional tejido-específico. En el lóbulo anterior de la hipófisis se genera la hormona ACTH, que al llegar a la glándula adrenal a través del torrente sanguíneo, se une a receptores específicos presentes en la superficie celular y dispara la respuesta biológica en los tejidos blanco [2-4;6].

Los efectos de ACTH sobre la esteroidogénesis pueden ser divididos en agudos (ocurren en minutos luego de la interacción hormona-receptor) y en crónicos (requieren horas o días para poder evidenciarse). El efecto agudo involucra la activación de las enzimas relacionadas con el camino biosintético de los esteroides (tanto de los mineralocorticoides como de los glucocorticoides) y de factores que intervienen en el transporte del colesterol hacia la mitocondria. El efecto crónico se refiere al incremento de la transcripción y traducción de enzimas involucradas en la síntesis de glucocorticoides [2;3;6].

La actividad adreno-cortical, como muchos otros procesos fisiológicos, varía a lo largo del día con un ritmo circadiano generado por el núcleo supraquiasmático en hipotálamo y sincronizado con el día solar por los cambios luz-oscuridad. En humanos, los glucocorticoides plasmáticos llegan a los niveles más altos antes del despertar y a los más bajos antes de las horas de sueño nocturno. En ratas, como en muchos otros animales de actividad nocturna, los niveles plasmáticos de corticosterona se presentan invertidos [2;3;29].

1.1.4. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE MINERALOCORTICOIDES

La aldosterona es el principal mineralocorticoide presente en el organismo, denominado así por sus efectos en el balance Na^+/K^+. Sus precursores, 18-hidroxicorticosterona, corticosterona y 11-desoxicorticosterona poseen actividad mineralocorticoide débil. A diferencia de los glucocorticoides, la secreción de

aldosterona se encuentra regulada por múltiples factores que poseen acciones regulatorias complejas. Los principales reguladores son, el sistema renina-angiotensina y el ion potasio; ACTH, los péptidos derivados del POMC, el ion sodio y otros agentes como ANP, dopamina, AVP, agentes ß-adrenérgicos, serotonina y somatostatina, son también moduladores de la secreción de aldosterona [2-4;6;30].

Sistema Renina-Angiotensina

La renina es una enzima que procesa al angiotensinógeno (una α-globulina sintetizada por el hígado) para producir un decapéptido llamado angiotensina I (AI). La AI es rápidamente procesada por la enzima convertidora de angiotensina, ubicada en pulmón y otros tejidos, para dar un octapéptido denominado angiotensina II (AII). La eliminación del residuo Asp N-terminal de AII da origen a la angiotensina III (AIII) (Figura 1.1.2.). La AI no posee efecto biológico conocido. La AII y la AIII son equipotentes en cuanto a la estimulación en la secreción de aldosterona, mientras que sólo la AII posee un potente efecto vasoconstrictor que ayuda a restablecer la presión sanguínea por contracción del músculo liso vascular [2;4;6;25;30;31].

El nivel de renina circulante constituye el factor limitante en este proceso. La renina se sintetiza en las células yuxtaglomerulares de la corteza renal como pro-renina. Su secreción se encuentra controlada, principalmente, por la presión sanguínea de la arteriola renal, por la concentración de sodio del fluido tubular, el cual es censado por la mácula densa, y por la actividad nerviosa simpática. Factores que producen una disminución del flujo sanguíneo renal, como hemorragias, deshidratación, deficiencia en sal, una postura erguida, o estrechamiento de la arteria renal, incrementan los niveles de renina plasmática. Factores que aumentan la presión sanguínea, como una dieta rica en sal o vasoconstrictores periféricos, disminuyen la secreción de renina [2-4;6].

La acción de AII y AIII sobre la glomerulosa está mediada por receptores de gran afinidad ubicados en la superficie celular que estimulan la síntesis y secreción de aldosterona. Una vez liberada a circulación, la aldosterona llega a los riñones donde estimula la reabsorción de sodio y la eliminación de potasio. Esta reabsorción de sodio es acompañada por la retención de agua y, consecuentemente, por la disminución del

volumen eliminado por orina, mecanismos que llevan a la restauración del volumen normal de los fluidos [2;3;30].

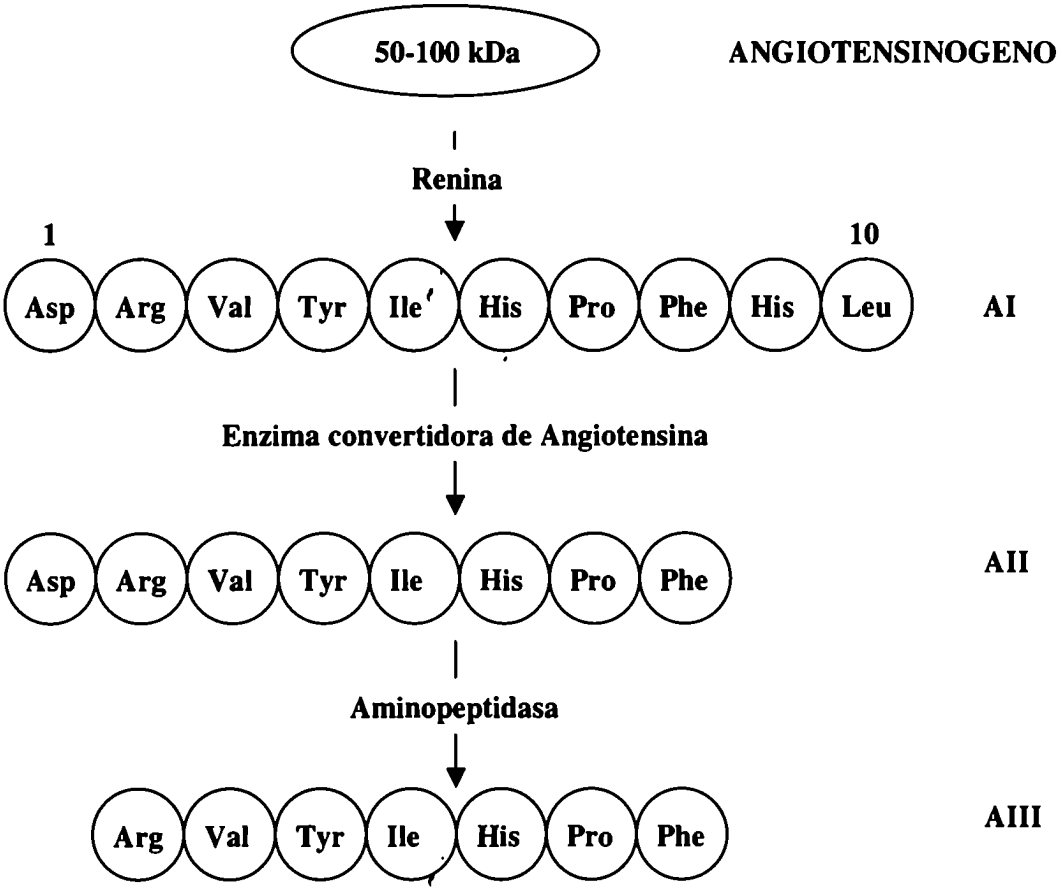


Figura 1.1.2. Secuencias aminoacídicas de Angiotensina I (AI), Angiotensina II (AII) y Angiotensina III (AIII) y los pasos secuenciales de su producción a partir del Angiotensinógeno (sustrato de la Renina) (*Extraído de [2]*).

La AII produce una inhibición directa en la secreción de renina por el riñón, mientras que la aldosterona reduce la actividad de la renina de manera indirecta, a través del incremento en la reabsorción de sodio y de la expansión del volumen plasmático [2;6].

La secreción de mineralocorticoides también se encuentra regulada por el sistema renina-angiotensina intra-adrenal. Se ha demostrado su existencia en la corteza adrenal, principalmente en la zona glomerulosa, en donde la AII actuaría de manera parácrina/autócrina sobre las células de la glomerulosa, estimulando la síntesis y secreción de aldosterona [4].

El ión potasio

Existe una relación recíproca entre el ión potasio presente en suero y la concentración de aldosterona. El ión potasio incrementa directamente la secreción de aldosterona por la corteza adrenal y, aldosterona, disminuye la concentración de potasio sérico por estimulación de su excreción en el riñón, cerrando el ciclo de regulación [2;6]. La acción primaria del potasio es la despolarización de la membrana plasmática de las células glomerulares, la cual activa canales de calcio voltaje-dependientes que permiten el ingreso del calcio extracelular. El aumento en la concentración de calcio citosólico estimula la síntesis y secreción de aldosterona [2].

Factores pituitarios

ACTH y otros péptidos derivados del POMC regulan la secreción de aldosterona [2;4;6]. Niveles fisiológicos de ACTH circulante, producen una importante estimulación de la síntesis y secreción de aldosterona en términos cuantitativos, sin embargo, su importancia fisiológica es discutible ya que no existe un mecanismo de retroalimentación negativa del eje hipotalámico-hipofisiario como en el caso de los glucocorticoides. Además la secreción basal de aldosterona es normal en ausencia de ACTH endógeno [2].

Niveles farmacológicos de ACTH circulante o su secreción crónica, llevan a una inhibición en la síntesis de aldosterona.

La estimulación o inhibición en la síntesis de aldosterona, mediada por ACTH depende de la especie en estudio. Así, la rata, un productor exclusivo de corticosterona, es mucho más sensible al efecto inhibitorio de ACTH que un productor de cortisol (humano) y esto, probablemente, se deba a causas homeostáticas [32;33].

Algunos péptidos derivados del POMC como el péptido N-terminal, la hormona estimulante de los melanocitos α (α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone), la hormona estimulante de los melanocitos ß (ß-MSH, ß-melanocyte-stimulating hormone), la hormona lipotropina ß (ß-LPH, ß-lipotropin hormone) y ß-endorfina (ß-END, ß-endorphin), estimulan directamente la secreción de aldosterona, mientras que otros péptidos, como la hormona estimulante de los melanocitos γ (γ-MSH, γ-melanocyte-stimulating hormone) actúan de manera sinergística sobre la acción de ACTH [2;4;6].

AVP posee un efecto estimulatorio transitorio sobre la secreción de aldosterona por las células de la zona glomerulosa [2;4;29].

El ión sodio

La administración de sodio al organismo influencia la secreción de aldosterona mediante efectos indirectos, a través de cambios en la secreción de renina y, en menor medida, mediante efectos directos sobre la acción de AII en la zona glomerulosa [2;4;6].

Una dieta alta en sodio aumenta el volumen vascular, suprimiéndose la secreción de renina y la generación de AII; mientras que una deficiencia en sodio lleva a un incremento en la secreción de esta enzima [2;4].

Otros agentes estimulatorios

La administración de cloruro de amonio al organismo induce una acidosis metabólica que estimula la secreción de aldosterona sin necesidad de cambios en las concentraciones de potasio sérico, renina, AII o cortisol, lo cual sugiere un efecto

directo de los protones [2]. Una serie de neurotrasmisores como norepinefrina, acetilcolina, NPY, VIP, serotonina y algunas prostaglandinas han sido hallados en las inervaciones adrenales, mostrando un efecto estimulatorio en la secreción de aldosterona [2;4].

La endotelina, no sólo actúa como un potente vasoconstrictor *per se*, sino que además es un potenciador sinérgico de otros factores como ACTH y AII [2;4;29].

Agentes inhibitorios

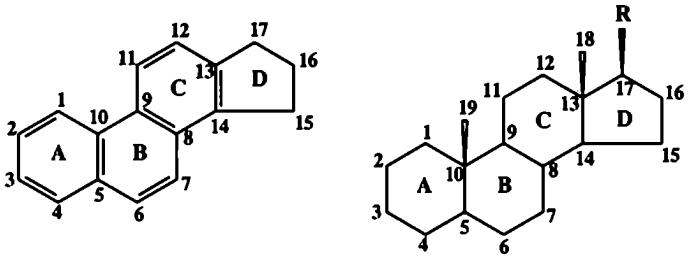
A través de las inervaciones dopaminérgicas presentes en la corteza adrenal, la dopamina inhibe en forma directa la secreción de aldosterona [2;4].

El péptido natriurético atrial secretado por el corazón en respuesta a incrementos crónicos en el volumen sanguíneo y/o aumento de presión, inhibe directamente la secreción de aldosterona y bloquea los efectos estimulatorios de la AII, del ión potasio y de ACTH [2;4].

1.2. MECANISMOS DE ACCIÓN Y SELECTIVIDAD DE LAS HORMONAS CORTICOIDES

1.2.1. GENERALIDADES

Los esteroides son hidrocarburos policíclicos que pueden ser vistos como análogos saturados del ciclopentanofenantreno. La designación y numeración del esqueleto carbonado se muestra en la Figura 1.2.1. En la mayoría de los esteroides, las uniones entre los anillos C/D y B/C, se presentan en *trans*. Los sustituyentes por encima del sistema de anillos se denominan ß y aquellos por debajo se denominan α. La unión entre los anillos A/B puede ser *cis* o *trans*.



CICLOPENTANOFENANTRENO ESTEROIDE HIDROCARBONADO

Figura 1.2.1. Estructuras químicas del ciclopentanofenantreno y del esteroide saturado que constituye el esqueleto carbonado de las hormonas esteroides.

Los esteroides involucrados en la fisiología de los mamíferos incluyen las hormonas corticoides producidas por la glándula adrenal, la vitamina D, los ácidos biliares y las hormonas sexuales. Todas estas moléculas son muy polares debido a que el núcleo básico del esteroide presenta muchas funciones oxigenadas, mostrando una amplia diversidad de efectos biológicos que dependen de las modificaciones químicas sufridas por las mismas.

Si consideramos a las hormonas corticoideas, aldosterona, corticosterona y cortisol, se puede observar que éstas comparten algunas características químicas (Figura 1.2.2): el grupo hidroximetilcetona en la posición C-17, la función –OH en la posición C-11 y el sistema cetona-α,ß no saturado desde la posición C-3 hasta la posición C-5. Por otro lado, los corticoides como cortisona y 11-dehidrocorticosterona, que poseen una pobre actividad glucocorticoidea, presentan una función ceto en la posición C-11, en lugar del –OH libre, y por esta razón, una menor polaridad.

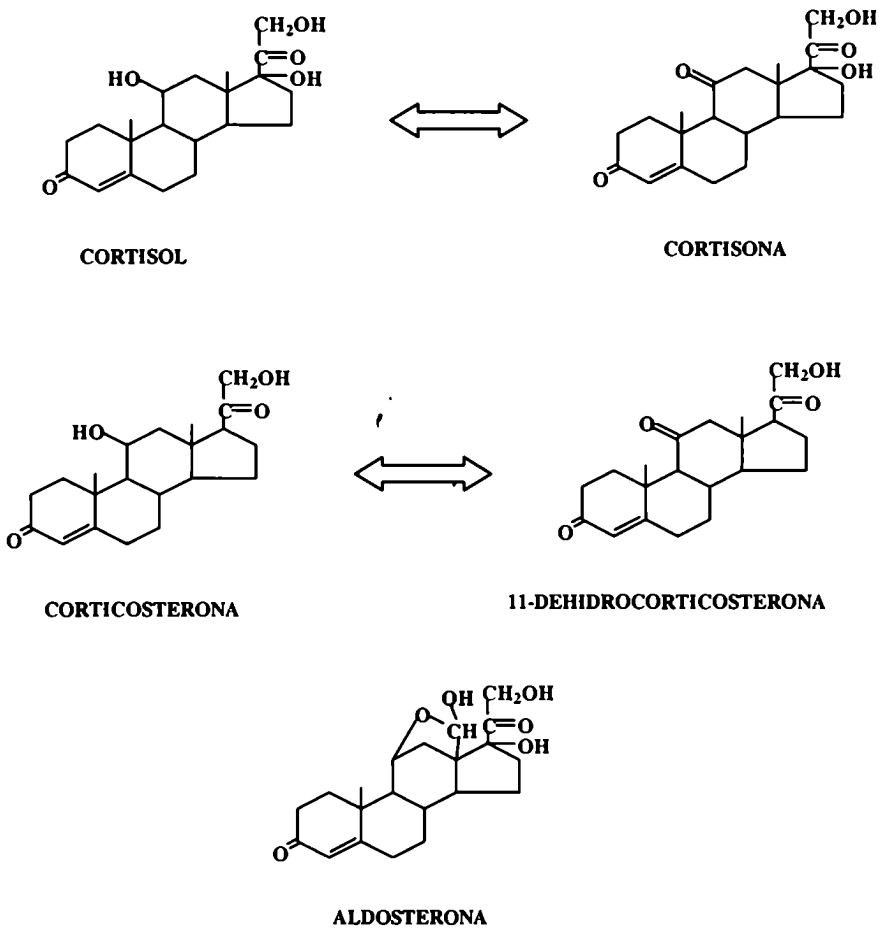


Figura 1.2.2. Estructura química de las hormonas corticoideas y sus metabolitos.

El colesterol juega un papel clave como precursor bioquímico de las hormonas esteroideas. Los tejidos esteroidogénicos utilizan múltiples fuentes de colesterol que aseguran un adecuado suplemento de sustrato para la esteroidogénesis. Estas fuentes incluyen: 1) síntesis de colesterol *de novo* a partir de acetil-coenzima A; 2) movilización del colesterol intracelular almacenado como éster de colesterol, por activación de la enzima colesterol-esterasa y 3) incorporación del colesterol plasmático asociado a lipoproteínas.

Alrededor del 80% del colesterol utilizado proviene de las lipoproteínas circulantes y, en condiciones normales, aproximadamente el 20% proviene de la biosíntesis intracelular [2;6;29].

Debido a su carácter lipofílico, las hormonas esteroideas pueden atravesar fácilmente las membranas celulares por difusión simple. Sus efectos clásicos están mediados por receptores solubles intracelulares pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares activables por ligando [34-38]. Esta superfamilia no sólo incluye a los receptores de hormonas esteroideas, sino también a los receptores de hormonas tiroides, vitamina A y vitamina D, y a los receptores nucleares huérfanos [2;6;34;39].

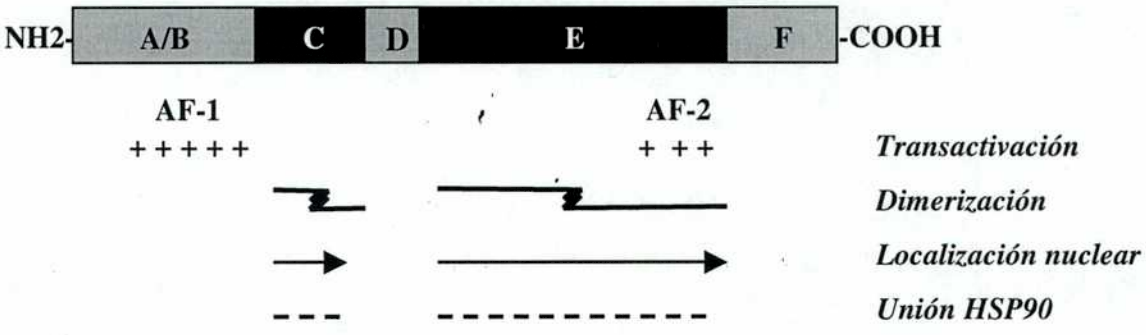


Figura 1.2.3. *Estructura de los receptores de hormonas esteroideas y su relación estructura-función.* Los dominios estructurales se encuentran numerados de la A a la F, basado originariamente en las secuencias de los receptores de estrógenos y de glucocorticoides humanos. El dominio C es el dominio de unión al ADN y el dominio E es el dominio de unión al ligando. AF-1 y AF-2 corresponden a las funciones de activación de la transcripción independiente de ligando y dependiente de ligando, respectivamente. Se encuentran indicadas las regiones necesarias para la dimerización, localización nuclear y la unión a la HSP90 (*Esquema extraído [40]).*

La organización estructural de los receptores nucleares es similar, independientemente de su ligando (Figura 1.2.3.). Con algunas excepciones, estas proteínas contienen una región N-terminal, poco conservada, en donde se ubica la función de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1); un dominio de unión al ADN, que contiene dos motivos "dedos de Zinc" altamente conservados y que direccionan al receptor hacia la secuencia específica del ADN, conocida con el nombre de "elemento de respuesta hormonal" (HRE, hormonal responsive element); una región bisagra que le otorga flexibilidad a la molécula permitiendo, simultáneamente, la dimerización del receptor y la unión al ADN; y una región C-terminal que contiene al dominio de unión al ligando, en donde los últimos 249 residuos aminoacídicos forman un bolsillo hidrofóbico que es el que recibirá al esteroide. Esta región contiene, además, una zona involucrada en la unión de la proteína de 90 kDa activable por calor (HSP90, heat shock protein 90 kDa), un dominio de dimerización y la función de activación de la transcripción dependiente de ligando (AF-2) [2;6;8;34;36;37;40;41].

Luego de la unión del ligando, el receptor sufre una serie de cambios conformacionales que llevan, mayormente, a su dimerización y, en aquellas situaciones en que el complejo ligando-receptor se haya constituido en el citoplasma, ocurre la translocación del mismo al núcleo. En el núcleo, el complejo interaccionará con las secuencias HRE presentes en el ADN, produciendo la activación o represión de genes específicos [40-42].

Para el caso de los glucocorticoides y mineralocorticoides, sus efectos clásicos están mediados por dos tipos de receptores: los receptores de mineralocorticoides (MR) o receptores tipo I y los receptores de glucocorticoides (GR) o receptores tipo II. Estas dos hormonas corticoideas actúan formando un patrón complejo, distintivo y a la vez complementario, que aún no ha podido ser completamente dilucidado [43;44].

El MR une a los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) y a los mineralocorticoides (aldosterona), con similar y alta afinidad ($K_d \cong 0,5$ nM), sin embargo la disociación de la aldosterona del MR es cinco veces más lenta que la de los glucocorticoides [38].

El GR une corticosterona, pero con menor afinidad que el MR ($K_d \cong 2,5$-$5,0$ nM)

[38;44;45].

1.2.2. LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS MINERALOCORTICOIDES

Los glucocorticoides

Los glucocorticoides ejercen una gran variedad de acciones fisiológicas que en su conjunto se designan como "efectos pleiotrópicos". Los mecanismos que intermedian estas acciones no siempre son genómicos, especialmente los de respuesta rápida tales como la redistribución de linfocitos [46;47] y algunas acciones en el sistema nervioso central (SNC) [48].

El GR es, entre todos los receptores hormonales el de mayor distribución, hallándose prácticamente en todos los tejidos del organismo mamífero. Es importante señalar que, si bien los glucocorticoides poseen mayor afinidad por el MR que por el GR, este último es específico para ellos y por consiguiente menos promiscuo que el MR. Efectos tales como la gluconeogénesis, la apoptosis en timocitos y la maduración pulmonar, están mediados por el GR.

A nivel intracelular el GR reside, predominantemente, en el citoplasma en una forma inactiva hasta que se une a su ligando. El GR inactivo se halla formando un complejo multimérico con una gran variedad de proteínas, incluyendo a proteínas pertenecientes a la familia de las HSP: HSP90, HSP70 y HSP56. Estas proteínas actúan como "chaperonas", manteniendo a los receptores en una estructura tal que permita la unión del ligando (Figura 1.2.4.) [2;6;8;34].

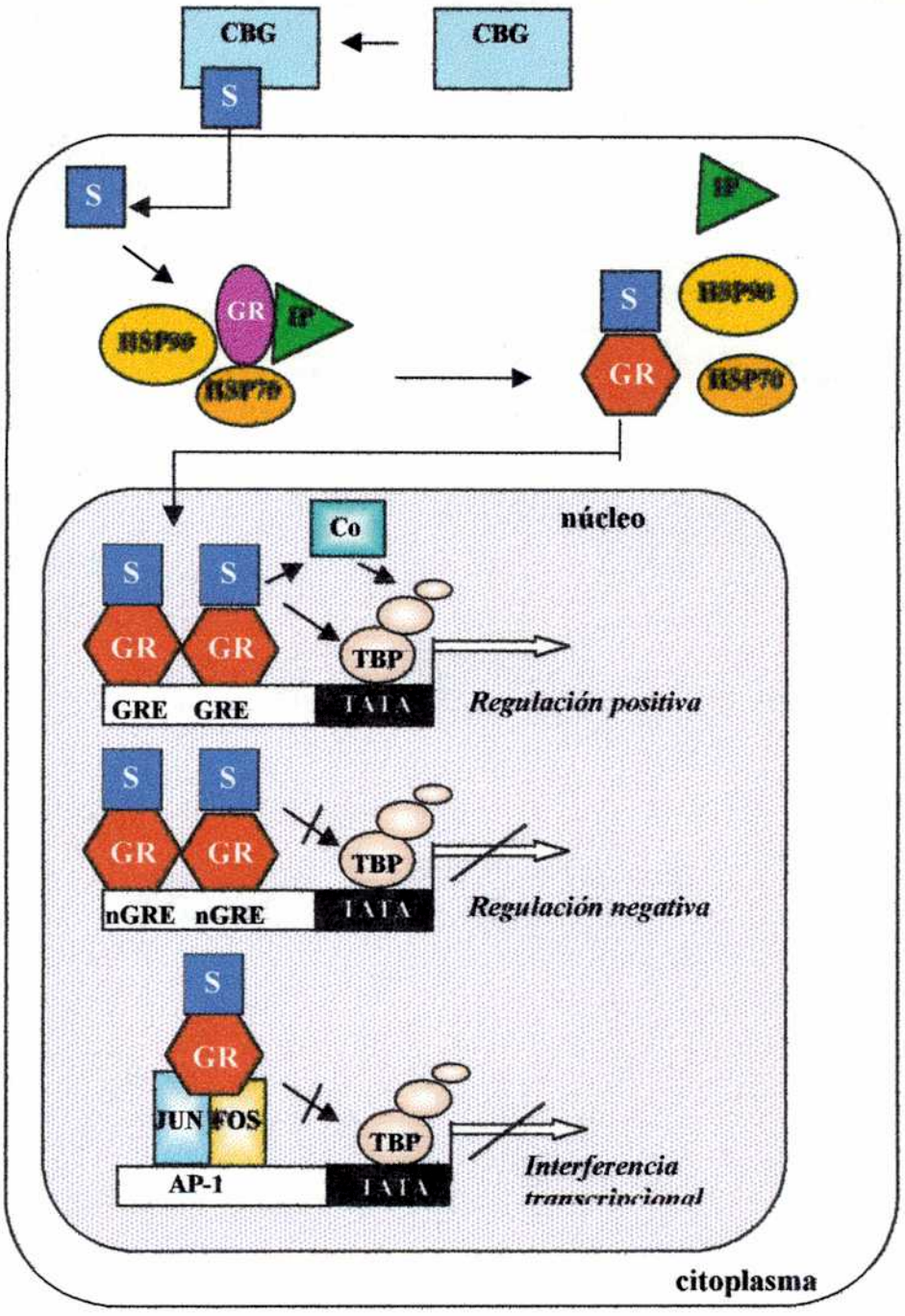


Figura 1.2.4. *Mecanismos de acción del receptor de glucocorticoides.* Se muestra el camino a través del cual los glucocorticoides (S), entran a las células e interaccionan con el GR, cambiando su conformación (indicado por el cambio en la forma del GR), induciendo su translocación al núcleo, y modulando la transcripción de genes específicos. CBG: globulina unidora de corticoides; GR: receptor de glucocorticoides; S: hormona esteroide; HSP90: proteína de 90 kDa activable por calor; HSP70: proteína de 70 kDa activable por calor; IP: proteína de 56 kDa, inmunofilina; GRE: elemento positivo de respuesta a glucocorticoides, presente en el ADN, nGRE: elemento de respuesta negativo, AP-1: secuencia de reconocimiento para la proteína activadora-1, Co: coactivador, TATA: región promotora, TBP: proteína que se une a la región TATA del promotor, JUN-FOS: factor de transcripción heterodimérico AP-1.

Luego de la unión al ligando, el GR se libera de sus proteínas asociadas, se dimeriza y transloca al núcleo. En el núcleo interacciona con secuencias de ADN específicas dentro de regiones regulatorias de genes particulares. Los mecanismos por los cuales el GR modula la transcripción, son complejos y no están completamente dilucidados; se sabe que existe, por un lado, interacción del GR con proteínas que regulan la maquinaria de transcripción basal y por otro, con factores de transcripción tejido-específicos [40;49;50] que actúan cooperativamente o de forma antagónica [2;6;8;40].

Existen, al menos, tres modelos a través de los cuales los glucocorticoides ejercerían su acción (Figura 1.2.4.) [2;6;34-37;40;41;44]:

1) *Activación de la transcripción*, vía la unión del GR a secuencias de ADN específicas denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, glucocorticoid responsive element). Las secuencias GRE poseen una estructura palindrómica constituida por dos medios sitios de 6 pb separadas por 3 pb no conservadas. Los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona y andrógenos, reconocen la misma secuencia AGRACAnnnTGTYCT (en donde Y se refiere a una base pirimidínica y R a una purina). Esta organización palindrómica sugiere que los receptores se unen al ADN como dímeros.

   Existen múltiples evidencias de que los receptores nucleares son capaces de contactar directamente con algunos miembros del complejo de iniciación de la transcripción. También existen evidencias de que contactan con otras proteínas denominadas coactivadores que actuarían como factores puente entre los receptores y el complejo de iniciación.

2) *Represión de la transcripción*, vía la unión del GR a elementos de respuesta negativos (nGRE). A pesar de que los glucocorticoides, predominantemente, actúan incrementando la expresión de genes específicos, existen unos pocos casos conocidos en donde producen represión de la transcripción. Entre los genes cuya transcripción es reprimida por glucocorticoides se encuentran, el gen de la prolactina y el POMC, siendo la represión de este último,

importante para la regulación de la retroalimentación negativa del eje HHA. El mecanismo propuesto para los efectos inhibitorios de los glucocorticoides involucra la interferencia con determinados factores de transcripción.

3) *Interferencia transcripcional*, vía interacción del GR con otros activadores transcripcionales, resultando en una regulación negativa. Son interacciones proteína-proteína, en donde el receptor contacta con otras dos proteína sin unirse directamente al ADN y reprime la transcripción. Ejemplo de ello son las interacciones con los factores de transcripción AP-1, NF-κB y GATA-1. En el caso de la interacción con AP-1, el GR en estado monomérico reprime la expresión del gen de la colagenasa tipo 1 y tipo 3.

Los mineralocorticoides

Los estudios de localización subcelular realizados para el MR, en ausencia de hormona, son bastante contradictorios. Algunos investigadores sugieren una localización, principalmente citoplasmática [51] mientras que otros han encontrado una distribución entre el núcleo y el citoplasma [52]. Sin embargo, en un trabajo reciente, Odermatt y col. demuestran que cuando el MR se coexpresa con la isoforma 2 de la enzima 11ßHSD (11ßHSD2, *ver punto 1.4. de la Introducción*) y en ausencia de corticosteroides, éste se ubica casi exclusivamente en citoplasma y colocaliza con la enzima en la membrana del retículo endoplásmico. Esta proximidad entre receptor y enzima permitiría una eficiente protección del MR frente al posible acceso de los glucocorticoides [35].

Al igual que el GR, el MR sin ligando se encuentra formando parte de un complejo hetero-oligomérico soluble. La unión de aldosterona inicia cambios conformacionales que llevan a la disociación del complejo, seguido de su dimerización y translocación al núcleo. Una vez en el núcleo el complejo ligando-receptor interacciona con las regiones GRE en el ADN regulando la expresión de esos genes [6;34-37;44].

Todos los estudios realizados hasta el momento, no han podido encontrar

diferencias en los motivos HRE que son reconocidos tanto por uno u otro receptor. Se cree que la activación diferencial, ejercida por estas hormonas, sobre un determinado grupo de genes, depende del tipo de dimerización llevada a cabo por los receptores (GR-GR, MR-MR o GR-MR) [44], de la abundancia relativa entre los MR y GR, de la interacción del complejo ligando-receptor con factores de transcripción tejido-específicos y de la abundancia relativa de ambos tipos de hormonas corticoideas, hecho que se relaciona con la promiscuidad de los receptores [6;49;50].

Efectos no-genómicos (rápidos) de los corticoides

Además de sus efectos "genómicos" clásicos, mediados por los receptores intracelulares, existen evidencias de efectos a tiempos cortos (no-genómicos) tanto de los mineralocorticoides como de los glucocorticoides, que involucrarían posibles receptores de membrana [38;46-48;53-64]. A través de estos receptores, las hormonas esteroideas podrían interaccionar con las vías de señalización de las hormonas peptídicas, representando posibles mecanismos para los efectos rápidos de los esteroides y para la modulación de la acción de las hormonas peptídicas [53;54;57;59;60].

Se han observado efectos rápidos de aldosterona en leucocitos humanos, células de músculo liso vascular, células renales derivadas de túbulo distal de perro (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney), células renales humanas y en cardiomiocitos de rata. La aldosterona induce el rápido incremento del inositol trifosfato y del calcio intracelular, regula la actividad de la proteína quinasa C (PKC, protein kinase C), activa a la bomba Na^+/K^+ y produce estimulación del canal epitelial de sodio (ENac, epithelial Na^+ channel) en células principales renales de conejo y en linfocitos [38;53-59;61-64]. En las células MDCK se ha encontrado que actúa a través del receptor de EGF, produciendo fosforilación de las proteínas quinasas activables por mitógenos (MAPK, mitogen activated protein kinase) y llevando a la activación del intercambiador sodio-protón (NHE, Na^+/H^+ exchanger), con aumento del pH intracelular e incremento de la entrada de calcio extracelular [53;56;62].

Los efectos rápidos de los glucocorticoides ocurren a través de las rutas de señalización de los factores de crecimiento y de la AII [53]. Se ha encontrado que en

arterias humanas y en células provenientes de músculo liso vascular, el cortisol produce activación del intercambio Na^+/H^+ [55;60]. Otros efectos rápidos (no-genómicos) producidos por los glucocorticoides son, la modulación de los niveles de calcio intracelular a través de la activación de proteínas G acopladas a PKC, la modificación del potencial de membrana de células excitables, la inhibición de la liberación de AVP del hipotálamo y la inhibición de la secreción de catecolaminas por las células cromafines de la glándula adrenal [48].

1.2.3. MECANISMOS GENERALES DE LOS EFECTOS CORTICOIDES

Metabolismo de los carbohidratos y las proteínas

La acción de los glucocorticoides sobre el metabolismo energético puede ser vista como un efecto protector sobre los tejidos dependientes de glucosa (cerebro y corazón), frente a una situación de hipoglucemia. Este efecto protector es llevado a cabo por estimulación de la síntesis de glucosa en el hígado, a partir de aminoácidos y glicerol (gluconeogénesis), y por aumento de los depósitos de glucógeno. En la periferia, los glucocorticoides disminuyen la utilización de glucosa, incrementan la catabolización de proteínas y activan la lipólisis; proveyendo de esta forma los aminoácidos y el glicerol necesarios para la gluconeogénesis [2;6;23;65].

Mientras que en el hígado, los glucocorticoides inducen la expresión de enzimas involucradas en la gluconeogénesis y en el metabolismo de los aminoácidos, incluyendo a la fosfoenol-piruvato carboxiquinasa (PEPCK, phosphoenol-pyruvate carboxykinase), a la glucosa-6-fosfatasa y a la fructosa-2,6-bifosfatasa; a nivel de los tejidos periféricos inhiben la captación de glucosa por internalización de sus transportadores, presentes en la membrana plasmática [2;6;65].

Otras hormonas gluconeogénicas, como glucagon y epinefrina, son ineficaces en ausencia de glucocorticoides [2;6], ya que necesitan de la acción permisiva de estos para poder ejercer su acción.

Metabolismo de los lípidos

Los glucocorticoides activan, de forma aguda, la lipólisis en tejido adiposo, aumentando en consecuencia, los niveles circulantes de ácidos grasos libres [2;6].

Además, existe un efecto "facilitador" de los glucocorticoides sobre la inducción de la lipólisis mediada por otros agentes, como la hormona de crecimiento y las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina [2;6].

Los glucocorticoides también ejercen efectos crónicos sobre el metabolismo de los lípidos. Un ejemplo de ello es la dramática redistribución del tejido adiposo que se observa en personas con un exceso crónico de glucocorticoides, como por ejemplo en el sindrome de Cushing [2;6;66-68], en donde hay un aumento en la deposición de grasas en las regiones dorsocervical, supraclavicular y en el abdomen [2;69].

Balance electrolítico y de fluidos

La aldosterona es la principal hormona mineralocorticoide que regula la excreción de electrolitos y el volumen intravascular. Su acción se evidencia, principalmente, a nivel del túbulo renal distal y túbulo colector cortical, en donde aumenta la reabsorción de sodio y agua, y la excreción de potasio y de protones hacia el lumen tubular. Actúa sobre las células principales e intercalares del túbulo colector. En las células principales produce reabsorción de sodio y genera un gradiente de potencial negativo luminal que ayuda a la excreción de protones, mientras que en las intercalares incrementa la actividad de la bomba protón-adenosin trifosfatasa (H^+-ATPasa) [6;70].

Recientes estudios han identificado algunos de los mecanismos por lo cuales aldosterona modifica los fluidos y el transporte de electrolitos. Luego de su unión al MR se inicia una secuencia de eventos que incluyen la inducción rápida de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides, la cual, a su vez, fosforila y activa al ENaC presente en la membrana apical. Este aumento en la reabsorción de sodio por las células del epitelio distal, estimula la actividad de la bomba sodio/potasio-adenosin trifosfatasa (Na^+/K^+-ATPasa) ubicada en la membrana basolateral [6;38;43;71-73].

Adicionalmente a sus efectos rápidos, aldosterona también incrementa la síntesis

de algunos de los componentes que forman parte de estas proteínas de membrana. Estimula la transcripción de las subunidades α, β y γ del ENaC de manera tejido-específica [43;44] y aumenta la transcripción de las subunidades α_1 y β_1 de la Na^+/K^+-ATPasa [43].

Los mineralocorticoides también actúan a nivel del túbulo proximal renal, en donde estimulan la acidificación tubular por aumento en la expresión de la isoforma 2 del NHE (NHE2), presente en la membrana apical [70;74;75].

Este transporte de electrolitos que ocurre a nivel renal también se da en otros tejidos blanco de aldosterona como son el colon y conductos de las glándulas salivales y sudoríparas [2;6].

Un exceso de mineralocorticoides produce un aumento en la reabsorción de Na^+ con la consecuente expansión del volumen de los fluidos extracelulares, hipopotasemia y alcalosis. El exceso crónico de aldosterona puede llevar a la generación de hipertensión arterial [2;6]. Por otro lado, una deficiencia en mineralocorticoides, lleva a una gran eliminación de Na^+, contracción del volumen de los fluidos extracelulares, hiponatremia, hiperpotasemia y acidosis.

Los glucocorticoides afectan el balance electrolítico y de los fluidos debido a sus efectos permisivos sobre la función tubular renal y sobre la regulación de la tasa de filtración glomerular:

Incrementan la filtración glomerular, por aumento del flujo sanguíneo de la arteriola aferente, obteniéndose una mayor cantidad de compuestos filtrados hacia el lumen (HCO_3^-, Na^+ y agua) [76].

Aumentan la oferta de buffers al fluido tubular al disminuir la reabsorción de fosfatos. Este efecto contribuye a que el pH luminal no llegue a valores muy bajos [77-79].

Aumentan la síntesis de amoníaco a partir de glutamina, ya que favorecen su accesibilidad a las enzimas involucradas en su deaminación [80].

Aumentan la acidificación tubular y la reabsorción de sodio por aumento de la isoforma 3 del NHE (NHE3), ubicado en la membrana apical proximal

[70;74;75].

Es importante tener en cuenta que bajo ciertas circunstancias los glucocorticoides juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis sodio-potasio. Se ha observado que la administración de corticosterona a ratas intactas o adrenalectomizadas, produce un aumento en la eliminación de potasio sin modificación del balance del sodio. Sin embargo, si los animales son previamente tratados con carbenexolona (inhibidor de la actividad 11ßHSD), aparece un potente efecto sodio retentor y una amplificación en la eliminación de potasio, los cuales sólo pueden ser revertidos por la administración de antagonistas del MR. Estas evidencias, en su conjunto, indicarían que la regulación del balance sodio-potasio ejercida por los glucocorticoides, está mediada por el MR [35;81;82].

Además de sus efectos sobre los cationes monovalentes y el agua, los glucocorticoides producen una disminución del Ca^{2+} total dentro del organismo. Interfieren con la captación de Ca^{2+} por el intestino, a través de un mecanismo todavía desconocido y aumentan la excreción del Ca^{2+} por el riñón, efecto que se ve exacerbado por inhibidores de la 11ßHSD2, indicando que la regulación ejercida por los glucocorticoides es a nivel distal [6;83].

La 18-hidroxicorticosterona, intermediario en la síntesis de aldosterona, si bien no puede ser clasificado como glucocorticoide puro ni como mineralocorticoide puro, actúa a nivel proximal regulando de manera muy potente, la acidificación urinaria a través de la modulación del intercambio Na^+/H^+ en la membrana apical [74;79;84-87].

Regulación del sistema cardiovascular

El principal efecto de los corticoides sobre el sistema cardiovascular se debe a los cambios en la excreción de Na^+ mediada por los mineralocorticoides. Trabajos realizados por el grupo de Funder han demostrado que aldosterona también posee acción directa sobre el corazón y sobre la pared vascular, produciendo hipertrofia y fibrosis cardíaca [38;88].

Los glucocorticoides afectan el tono vascular por modulación de la acción de

varias sustancias vasoactivas. Amplifican las acciones vasoconstrictoras de las catecolaminas y de la AII, sobre las células del músculo liso vascular, mientras que por otro lado, disminuyen la biosíntesis de óxido nítrico y de prostaglandinas y, atenúan las acciones vasorelajantes del ANP. Todos estos efectos de los glucocorticoides sobre el tejido vascular, llevan a un incremento del tono vascular [6;89].

Músculo esquelético y tejido conectivo

Los corticoides son necesarios para el normal funcionamiento del músculo esquelético. Los glucocorticoides están involucrados en la degradación de proteínas del músculo para ser utilizadas como fuente de sustrato para la gluconeogénesis [2;6].

El exceso o deficiencia de glucocorticoides o de mineralocorticoides produce efectos nocivos sobre las funciones musculares [2;6]. Por ejemplo, en patologías caracterizadas por un aumento en los niveles de aldosterona, existe debilidad muscular como resultado de la pérdida masiva de potasio, mientras que el exceso de glucocorticoides, por periodos prolongados, lleva al desgaste muscular por mecanismos todavía desconocidos [6]. La ausencia de corticoides lleva a problemas musculares. Pacientes con la enfermedad de Addison, en donde existe una deficiencia en glucocorticoides, sufren de debilidad muscular y fatiga [6].

Sobre el tejido conectivo, los glucocorticoides, modulan las funciones y la proliferación de los fibroblastos. La mayoría de los efectos son inhibitorios, como la supresión de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, hialuronidato y colágeno. El principal efecto clínico debido a un exceso crónico de glucocorticoides es la imposibilidad de cicatrización de las heridas. También existen algunos efectos estimulatorios de los glucocorticoides sobre los fibroblastos, por ejemplo, el aumento en la producción de fibronectina y elastina [2].

Sistema nervioso central

Los corticosteroides ejercen un gran número de efectos indirectos sobre el SNC, regulando la presión sanguínea, los niveles de glucosa circulantes y las concentraciones de electrolitos. También actúan de forma directa, regulando la conducta, los patrones de sueño y la excitabilidad cerebral [2;6].

En el SNC, los glucocorticoides influencian la actividad cerebral y las funciones relacionadas con el estrés. Altos niveles crónicos de glucocorticoides poseen efectos deletéreos sobre la sobrevida y funcionalidad del hipocampo, estando estos procesos asociados con cambios estructurales, disfunciones neuroendócrinas y pérdida de la memoria [2;6;8;90;91].

Acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras

Los glucocorticoides tienen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores por alterar la respuesta inmune de los linfocitos. Inhiben la producción de múltiples factores necesarios para generar la respuesta inflamatoria. Disminuyen la liberación de sustancias vasoactivas y quimiotácticas, provocando un decrecimiento en la extravasación de los leucocitos hacia las áreas de injuria [2;6].

A pesar de que tradicionalmente siempre se consideró a los glucocorticoides como agentes inmunosupresores, observaciones recientes demuestran que en el estrés crónico existe una supresión de la respuesta inmune celular mientras que hay estimulación de la respuesta humoral. Este efecto estaría mediado por la acción diferencial de los glucocorticoides y las catecolaminas sobre la población de linfocitos T [6;92;93].

1.2.4. ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA SELECTIVIDAD MINERALOCORTICOIDEA: MR, GR y 11ßHSD2

Debido a que el MR posee una afinidad similar tanto por aldosterona como por los glucocorticoides, el hecho de que estos últimos sean más abundantes en plasma

(entre 100 y 1000 veces) que aldosterona, explica la necesidad de un mecanismo que proteja al MR de la ocupación permanente por los glucocorticoides.

La enzima 11ßHSD2, encargada de inactivar a los glucocorticoides y de esta manera de impedir su unión al MR (*ver punto 1.4 de la Introducción*), se coexpresa con el MR y el GR en todas las células epiteliales blanco de aldosterona (células epiteliales de túbulo distal renal [44], epitelio distal de colon [44;94], glándula sudorípara [44;95]). En células no epiteliales, por ejemplo miocitos cardíacos provenientes de conejo y humanos, también se ha encontrado coexpresión de esta isoenzima (*ver punto 1.4. de la Introducción*) [96;97].

El MR cerebral, por lo menos en hipocampo, une al cortisol y a la corticosterona con alta afinidad (debido a los bajos niveles de expresión de la 11ßHSD2 en esas regiones), y baja capacidad; por lo que bajo condiciones basales se encuentra casi completamente ocupado por los glucocorticoides. Por otro lado, los GRs, que poseen baja afinidad (y alta capacidad), en condiciones basales se encuentran, prácticamente, libres de ligando; sin embargo comienzan a ocuparse progresivamente durante el pico diurno o ante una situación de estrés. Es decir que durante el nadir diurno cuando los niveles de glucocorticoides son bajos, sólo ocurrirían las funciones mediadas por el MR cerebral. A altas dosis de glucocorticoides, los GRs se irían ocupando y, coordinarían o antagonizarían las funciones mediadas por el MR [8;44;98]. Estas conclusiones, sin embargo, no explican los efectos mediados por el MR central, como el apetito salino y la presión sanguínea, los cuales son específicos de aldosterona y no pueden ser mimetizados por corticosterona [8;44].

Además del efecto protector que cumple la 11ßHSD2 en la mayoría de los tejidos blanco de aldosterona, el MR posee propiedades intrínsecas que le permiten discriminar entre aldosterona y las hormonas glucocorticoides. A pesar de su afinidad similar por ambos tipos de hormonas, se ha observado que la interacción del MR con aldosterona posee una vida media más prolongada [99] en comparación con el complejo formado entre las hormonas glucocorticoides y el MR. Al parecer, existen interacciones moleculares diferentes entre el MR y sus ligandos, siendo la unión de aldosterona al MR más compacta [100]. Estas propiedades distintivas del MR, dependiendo del ligando, modifica, consecuentemente, su capacidad de transactivación [99;101].

Si bien, 11ßHSD2 posee una alta eficiencia en la metabolización de la mayor parte de las hormonas glucocorticoides que ingresan a la célula, parte de los glucocorticoides escapa a la inactivación y ocupa los MRs (y GRs) [102]. Esto constituiría un mecanismo regulador muy importante en las células blanco de aldosterona, ya que permitiría la variación de la proporción de cada receptor unido a cada ligando. Además, el hecho que se puedan formar homodímeros (MR-MR, GR-GR) o heterodímeros (MR-GR), los cuales poseen, a su vez, diferentes propiedades transactivadoras, permite que la transcripción de los genes blanco responda a un patrón específico y muy regulado, el cual variará con el estado y disponibilidad de los corticoides. Cualquier cambio en la actividad de la 11ßHSD2 modificará la serie de equilibrios dinámicos posteriores, es decir la proporción relativa de receptores ocupados por cada ligando [99;101].

1.3. EL RIÑÓN DE MAMÍFEROS

El organismo se encuentra en constante lucha por mantener el equilibrio ácido-base, alterado especialmente por el metabolismo tisular y, en los últimos años, también por los contaminantes ambientales. Para contrarrestar estas agresiones, el cuerpo cuenta con numerosas funciones enzimáticas, hormonales y de interacción iónica presentes, en mamíferos, principalmente en el pulmón y en el riñón [70].

El riñón de mamíferos cumple un rol importante en la regulación de la homeostasis ácido-base, realizando las siguientes funciones: 1) intercambio de sodio por protones, con la reabsorción de sodio y la eliminación consecuente de protones; 2) secreción activa de protones; 3) reabsorción de bicarbonato y fosfatos y 4) filtración y síntesis de moléculas aceptoras de protones que son, en su mayoría, eliminadas por orina (los protones pueden ser eliminados como ion amonio sintetizado en el riñón, fosfatos monoácidos o diácidos y como agua, en este último caso, debido a la presencia de la anhidrasa carbónica en el lumen tubular proximal) [31;70].

1.3.1. ANATOMIA DEL RIÑÓN

La anatomía macroscópica del riñón de mamíferos se muestra en la Figura 1.3.1. Los órganos se presentan de a pares, cada uno a un lado de la columna vertebral, y próximos a la superficie interna dórsal de la parte inferior de la espalda. A pesar de su pequeño tamaño reciben una cantidad enorme de sangre (entre el 20-25% del gasto cardíaco total) [103].

Cada riñón posee un borde convexo y un borde cóncavo en el cual se sitúa el hilio. Éste contiene vasos, nervios y unas estructuras encargadas de recibir la orina que, por su forma, son denominadas *cálices*. Los cálices, se unen para formar la pelvis renal, que es la parte superior, dilatada, del uréter. Cada riñón se encuentra envuelto por una cápsula de tejido conectivo denso y presenta una zona cortical y una zona medular [103;104].

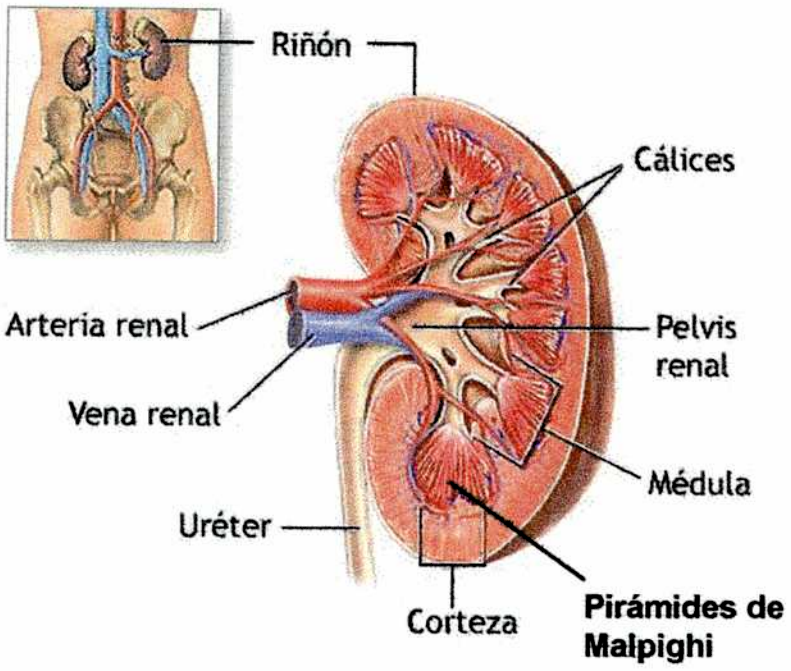


Figura 1.3.1. *Anatomía macroscópica del riñón (Extraído de www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1101.htm).*

La zona medular está formada por entre 10 a 18 estructuras piramidales, denominadas pirámides de Malpighi, cuyos lados entran en contacto con la zona cortical y cuyos vértices producen proyecciones hacia los cálices renales. Estas proyecciones son las papilas, cada una perforada por entre 10 a 25 orificios, formando el área cribosa [103;104].

La zona cortical ocupa el espacio dejado por las pirámides de Malpighi y el espacio entre éstas y la cápsula [103;104].

1.3.2. EL NEFRÓN

Los riñones están formados por la asociación de numerosas unidades anátomo-funcionales denominadas nefrones (entre uno y dos millones por riñón). Cada nefrón (Figura 1.3.2.) está formado por una parte inicial dilatada, constituida por el glomérulo

y la cápsula de Bowman, la cual es seguida por un intrincado sistema de túbulos epiteliales y de capilares [103;104].

La cápsula de Bowman es una estructura en forma de copa, a la cual se encuentra asociado un ovillo de capilares que forman el glomérulo y que se ubican en el interior de la misma. El filtrado de la sangre, proveniente del glomérulo, se acumula en la luz de la cápsula, y allí empieza su viaje por los distintos segmentos del túbulo renal hasta llegar por el túbulo colector a la pelvis renal. El grosor de la pared del túbulo renal es de una única capa de células epiteliales que separan la luz del túbulo, que contiene el filtrado urinario, del líquido intersticial [31;103-105].

El sistema de túbulos que forman parten del nefrón, puede dividirse en cuatro regiones principales teniendo en cuenta sus características anátomo-funcionales: 1) el túbulo proximal, 2) el asa de Henle, descendente y ascendente, 3) el túbulo contorneado distal y 4) el túbulo colector [31;70;103-105].

El glomérulo y la cápsula de Bowman

La capa celular interna de la cápsula de Bowman se encuentra ligada a los capilares del glomérulo. Entre las dos capas celulares que forman dicha cápsula se encuentra un espacio capsular que recibe el filtrado glomerular [31;70;103;104].

Después de entrar a la cápsula de Bowman la arteriola aferente se divide en una red de capilares cuyas células endoteliales presentan fenestras. La sangre llega al glomérulo por la arteriola aferente, pasa por el sistema de capilares en donde sufre el proceso de filtración y finalmente sale de la cápsula de Bowman por la arteriola eferente [31;104].

La capa celular externa de la cápsula de Bowman está formada por un epitelio pavimentoso simple, la capa interna está formada por células denominadas podocitos, de cuyos cuerpos parten prolongaciones que forman una red de filtración. Entre los podocitos y las células endoteliales fenestradas de los capilares glomerulares se encuentra la membrana basal, que es la única estructura continua que separa la sangre del espacio capsular [31;103;104].

El endotelio fenestrado, junto con la membrana basal que contiene una alta densidad de carga negativa y con los podocitos, forman lo que se conoce como barrera de filtración [103;104].

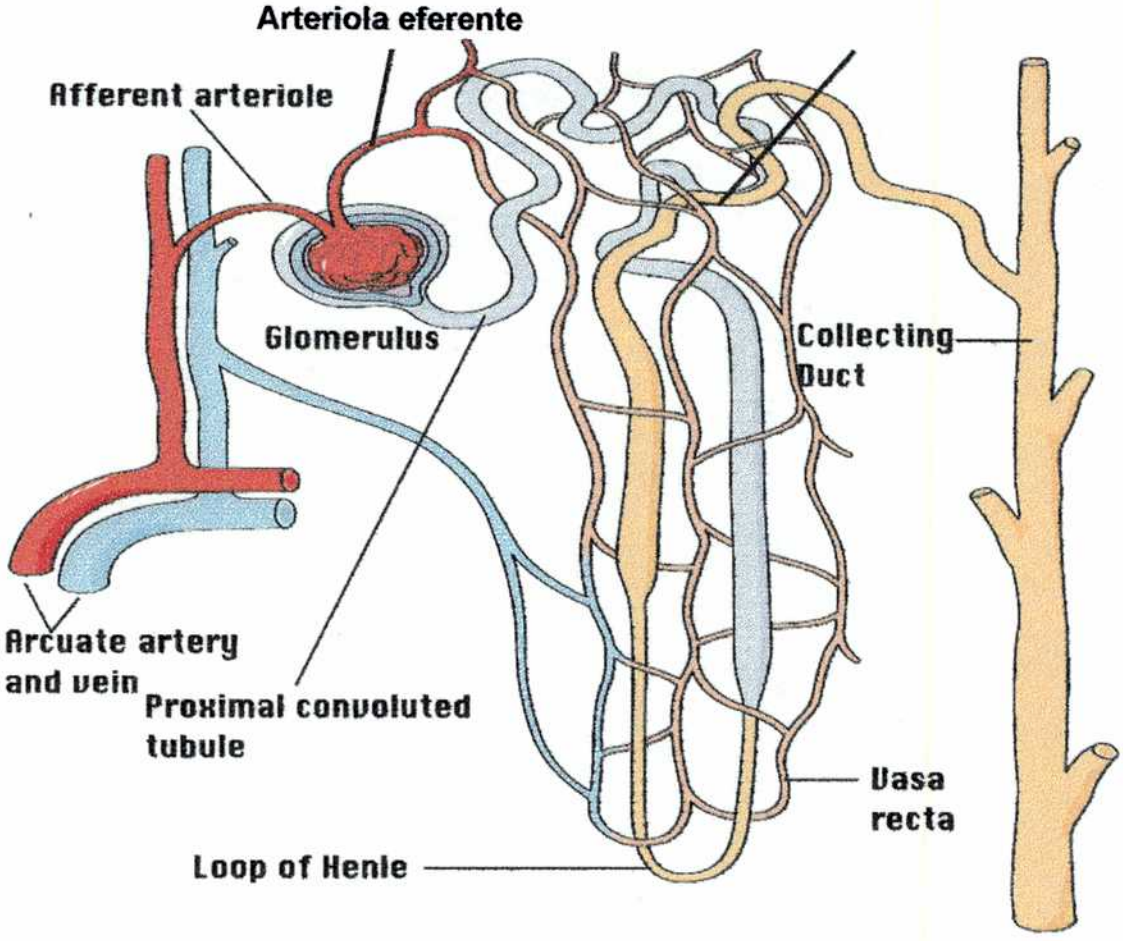


Figura 1.3.2. *Esquema de un nefrón.* En el esquema se puede observar tanto el sistema de túbulos que conforman al riñón, como la red de capilares del mismo. *Proximal convoluted tubule*: Túbulo contorneado proximal; *Loop of Henle*: Asa de Henle; *Collecting Duct*: Túbulo colector; *Afferent arteriole*: Arteriola aferente; *Glomerulus*: Glomérulo; *Vasa recta*: vasos rectos) (Extraído de www.kumc.edu/instruction/medicine/pathology/ed/ch_16/c16_snephron.html).

El túbulo proximal

El túbulo proximal se extiende desde la cápsula de Bowman hasta el asa de Henle, y en él se distinguen dos segmentos: el túbulo contorneado o *pars convoluta* y

una porción recta o *pars recta*. En varias especies, incluida la rata, se diferencian morfológicamente tres zonas: S1, S2 y S3. Las células epiteliales de la región S1 (que constituyen las dos terceras partes del túbulo contorneado proximal) presentan numerosos microvilli en el lado luminal o cara apical, estructura denominada ribete en cepillo. Esta superficie absortiva aumenta enormemente el área de la membrana involucrada en la difusión de sales y agua desde el lumen tubular al interior del organismo. La membrana basolateral del epitelio presenta invaginaciones junto con prolongaciones laterales y numerosas mitocondrias [31;106].

Las regiones S2 y S3 presentan células con un ribete en cepillo poco desarrollado y mitocondrias pequeñas.

El túbulo proximal está diseñado especialmente para la reabsorción masiva de sales y agua. En este segmento se reabsorbe por transporte activo, entre el 60% y el 70% del cloruro de sodio y le sigue, pasivamente, una cantidad proporcional de agua. La mayor parte del bicarbonato, fosfato, glucosa y aminoácidos filtrados por el glomérulo, son reabsorbidos en este segmento del nefrón [31;103;105].

El transporte de solutos y agua en esta región del nefrón se encuentra bajo la regulación de la hormona paratiroidea, las hormonas corticoides, norepinefrina, y AII, entre otras [70;74;75;84;105].

El asa de Henle

El asa de Henle se extiende desde la región S3 del túbulo proximal hasta el túbulo contorneado distal. Se puede dividir en dos segmentos: 1) la rama delgada del asa de Henle y 2) la rama ascendente gruesa del asa de Henle [31;106]. En la rama delgada del asa de Henle se pueden distinguir 2 regiones debido a sus diferencias anátomo-funcionales: la *rama descendente* y la *rama ascendente*. Ambas regiones están formadas por células delgadas, sin ribete en cepillo y con pocas mitocondrias. En la rama descendente, no hay transporte activo de solutos a través de la pared tubular. La permeabilidad a las sales y a la urea es muy baja, pero es permeable al agua. En la rama ascendente no hay transporte activo de sales, pero sí es permeable al sodio y al cloro, y posee muy baja permeabilidad para la urea y el agua. Estas permeabilidades

diferenciales, desempeñan una importante función en el sistema concentrador de la orina [31].

La rama delgada ascendente del asa de Henle responde a vasopresina [70;105;106].

La rama ascendente gruesa del asa de Henle está formada por células epiteliales que en la membrana apical poseen algunos microvilli. Difiere del resto del asa de Henle por presentar un transporte activo de sodio y cloro desde el lumen al espacio intersticial. También es medianamente permeable a cationes bivalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}). Esta región, al igual que el resto de la rama ascendente, tiene muy baja permeabilidad al agua. Como resultado de la reabsorción activa de sales, el líquido que llega al túbulo contorneado distal es hipoosmótico en relación al líquido intersticial [31;103;105]. La regulación en la reabsorción de solutos y agua está bajo el control, principalmente, de AVP y de calcitonina, y en menor medida de la hormona paratiroidea y glucagon [105].

El túbulo contorneado distal

El túbulo contorneado distal es importante en la eliminación de potasio, protones y amoníaco, y en la reabsorción de sodio, cloro y bicarbonato. La reabsorción de sales trae como consecuencia la entrada pasiva de agua. El transporte de sales está bajo control endócrino y se ajusta en respuesta a las condiciones osmóticas. Entre las hormonas que actúan sobre esta región del nefrón se encuentra la aldosterona y la calcitonina [31;103;105].

Túbulo colector

El túbulo colector, o más precisamente, el sistema colector, constituye el segmento terminal del nefrón y en él se dan los procesos finales en la formación de la orina. Comienza en la región más externa de la corteza, en los sitios en que se unen los túbulos contorneados distales, y se extiende a través de la médula hasta la papila. Posee dos tipos de células epiteliales: las más numerosas son las células principales, que poseen un citoplasma claro con pocas mitocondrias y una membrana apical con pocos

microvilli. El segundo tipo celular, las llamadas células intercalares, poseen un citoplasma oscuro, se encuentran siempre aisladas y rodeadas de las células principales. Su número decrece progresivamente a medida que el túbulo colector se interna en la médula [31;105;106].

El túbulo colector es permeable al agua, por lo que permite que esta difunda hacia el líquido intersticial de la médula renal, el cual se encuentra más concentrado. Hay reabsorción activa de sodio, eliminación activa y pasiva de potasio, reabsorción de cloro y transporte de bicarbonato. El extremo final del segmento medular posee una elevada permeabilidad a la urea [103;105].

A nivel hormonal el transporte de solutos se encuentra regulado por aldosterona, prostaglandias y agentes ß-adrenérgicos [105].

El aparato yuxtaglomerular

El aparato yuxtaglomerular se encuentra en las cercanías del glomérulo, esta formado por: 1) una parte de la pared de la arteriola aferente, en donde las células endoteliales presentan modificaciones morfológicas y funcionales. Estas células son llamadas yuxtaglomerulares, tienen forma cúbica, núcleos ovoides y un citoplasma cargado de gránulos. Esta región de la arteriola aferente no posee músculo liso; 2) una región modificada del túbulo contorneado distal cercana a las células yuxtaglomerulares. Este segmento del túbulo se presenta oscuro en cortes histológicos debido a la proximidad de los núcleos entre las células, de donde deriva la denominación de mácula densa; 3) las células llamadas mesangiales o *polkissen*, ubicadas entre las células yuxtaglomeruláres y la mácula densa [31;103-105].

El principal componente de los gránulos presentes en el citoplasma de las células yuxtaglomerulares, es la pro-renina, la cual es liberada al torrente sanguíneo por diversos estímulos, como enzima proteolítica activa. Entre estos estímulos se encuentra la activación de la inervación simpática, la disminución en la concentración plasmática de sodio y el aumento en la concentración de catecolaminas circulantes [103;104]. La norepinefrina, liberada por la estimulación de las terminaciones simpáticas actúa a través de receptores α-adrenérgicos produciendo vasoconstricción de la arteriola

aferente y liberación de pro-renina activa [107]. También puede liberarse frente a estímulos locales como la distensión de las paredes arteriolares debido a una disminución de la presión sanguínea [103;104].

La secreción de renina lleva a un aumento en la síntesis y secreción de aldosterona, la cual trae como consecuencia un aumento de la presión arterial por incremento en la reabsorción de sodio.

1.4. LAS 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASAS

Hasta hace una década se pensaba que los principales determinantes de la acción de los corticoides eran los niveles de hormona en sangre [23;65;66], su unión a proteínas plasmáticas (mayormente a la globulina unidora de corticoides) [66;108] y la variación en la densidad de receptores en los tejidos blanco [23;65;66]. Sin embargo, se encontró que un factor adicional e importante en la regulación de la respuesta del órgano blanco frente a la acción de los corticoides era su metabolización pre-receptor, ejercida por enzimas tejido-específicas [25;66]. Esta modulación de la acción de los esteroides debido a su metabolización local ha sido descripta también para otros esteroides, incluyendo los andrógenos (5α-reductasas) [66;108], estrógenos (17ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasa) [66;108;109] y para las hormonas tiroideas (5´-monodeiodinasas) [66;108]. En el caso de los glucocorticoides y los mineralocorticoides, las enzimas clave en esta regulación son las 11ßHSDs [23;65;66;108].

Si bien, en todos los ejemplos citados la metabolización local confiere un incremento en la potencia de la hormona circulante, no ocurre lo mismo para las hormonas corticoideas, en donde predomina el efecto protector de las 11ßHSDs sobre los receptores. Deja en claro, en todo caso, que para cada miembro de la superfamilia de receptores nucleares existe, al menos, una enzima encargada de controlar las concentraciones locales de su ligando específico.

La gran cantidad de estudios realizados sobre las funciones tejido-específicas de las 11ßHSDs [25;110-116] han permitido avanzar, no sólo en el entendimiento de la etiología de enfermedades muy comunes, como la hipertensión [25;66;114;115;117;118;119], la obesidad [25;66;94;115] y la diabetes [25;66], sino también, en el establecimiento de nuevos tratamientos terapéuticos que permitan luchar contra estas patologías [25;66].

1.4.1. DESCUBRIMIENTO DE LAS 11ßHSDs

Cerca de 50 años atrás Amelung y colaboradores, descubren la interconversión enzimática de los 11-hidroxiglucocorticoides activos (cortisol en humanos y corticosterona en roedores y primates no humanos) a sus formas 11-ceto inertes (cortisona y 11-dehidrocorticosterona) [66] (Figura 1.4.1); actividad que es, posteriormente, descripta para un amplio rango de células y tejidos [25;66].

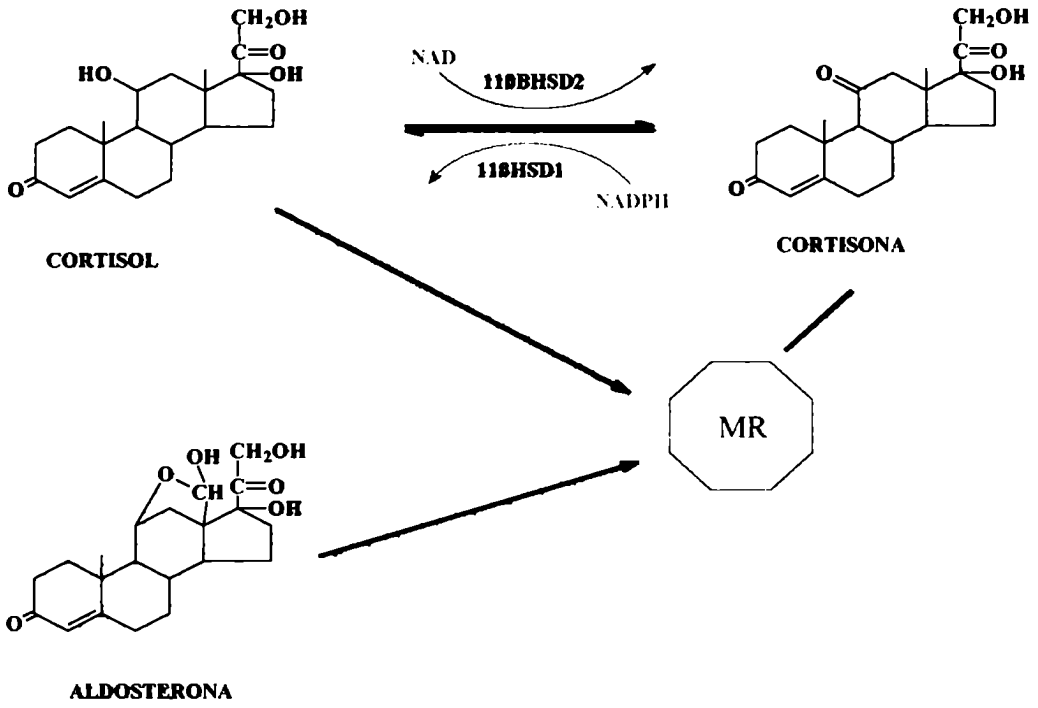


Figura 1.4.1. *Actividad 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.* La isoforma 1 NADP(H)-dependiente, realiza la interconversión de la cortisol (hormona activa) a cortisona (hormona inactiva), en roedores. La isoforma 2 NAD^+-dependiente realiza la conversión de cortisol a cortisona. La acción de la 11ßHSD2 permite que la aldosterona pueda unirse al MR, aún en presencia de un exceso de glucocorticoides circulantes.

A fines de los '80s, Monder y colaboradores purifican una actividad 11ßHSD dependiente de NADP(H) a partir de hígado de rata, la cual cataliza tanto la 11ß-deshidrogenación del cortisol a cortisona como así también la 11ß-reducción de la

cortisona a cortisol [120;121;122;123]. Más tarde, el grupo de Edwards en Edimburgo [124] y el de Funder en Melbourne [125] reconocen la importancia fisiológica de la inactivación del cortisol y encuentran que la actividad 11ßHSD en nefrón distal podía explicar la paradoja del MR. Esta se había originado a partir de estudios en donde el MR purificado o recombinante no era selectivo *in vitro*, uniendo a los glucocorticoides, cortisol y corticosterona, con similar afinidad que a aldosterona. Sin embargo, el mismo receptor *in vivo* era específico para aldosterona, aun en presencia de un exceso molar de glucocorticoides circulantes (entre 100 y 1000 veces más) [126;127].

La solución a esta paradoja la brindó la 11ßHSD, la cual inactiva a los glucocorticoides en las células blanco de aldosterona ubicadas en nefrón distal, permitiendo el acceso selectivo de los mineralocorticoides a sus receptores.

En 1989 Agarwal y col. [128] logran clonar el cADN de la 11ßHSD1 a partir de hígado de rata. Sin embargo, a pesar su alta expresión en riñón, no explicaba el efecto protector del MR en nefrón distal ya que esta enzima poseía una baja afinidad por 11-hidroxiesteroides y no respondía a la regulación y preferencia de cofactor vistos para la 11ßHSD distal.

Estas discrepancias se resolvieron con el descubrimiento de una segunda isoenzima, la 11ßHSD2, presente en túbulo colector [2;25;127;129-131].

La importancia fisiológica de la 11ßHSD2 en el control de la activación del MR, quedó puesta de manifiesto cuando se hallaron las causas moleculares que daban origen al sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides (AME, apparent mineralocorticoid excess) [82;132;133]. Los pacientes con AME sufren de hipertensión arterial severa perinatal, hiponatruria e hipopotasemia, debido a la ausencia de actividad 11ß-deshidrogenasa, causada por mutaciones en el gen que codifica para la 11ßHSD2.

La disminución de la actividad de esta isoforma, originada por la ingestión crónica de regaliz, producto derivado de la raíz de una planta denominada *Glycyrrhiza glabra* (*ver página 59*), también lleva a una hipertensión arterial, aunque reversible y no tan severa, pero con características clínicas similares al sindrome AME [25;25;44;44;134].

Recientemente se han encontrado factores endógenos que producen inhibición de la actividad enzimática y que se hallan aumentados en embarazadas, especialmente

durante el segundo y el tercer trimestre, y en personas que sufren de hipertensión esencial [82;108;135].

Todos estos factores inhibitorios de la actividad de la 11ßHSD2 actúan en un mismo sentido: permiten que los glucocorticoides se unan y activen a los receptores a mineralocorticoides y produzcan cuadros hipertensivos, con retención de sodio, hipopotasemia y baja renina y aldosterona circulantes.

1.4.2. LA 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA 1

Generalidades

La 11ßHSD1 es una glicoproteína con un peso molecular de 34.000, NADP(H)-dependiente, con una baja afinidad por cortisol y corticosterona (K_M en el orden del micromolar). Estos valores de K_M son dos órdenes de magnitud mayores que los niveles de circulantes de cortisol libre (1-100 nM) [25].

La 11ßHSD1 presenta actividad deshidrogenasa en homogenatos de tejido y en preparaciones microsomales, mientras que en células intactas e *in vivo*, actúa predominantemente como una reductasa, produciendo cortisol o corticosterona a partir de cortisona u 11-dehidrocorticosterona, respectivamente (Figura 1.4.1.) [66;71;136-140]. Este cambio en la direccionalidad entre células intactas y homogenatos, refleja la específica localización intracelular de la 11ßHSD1 en la cara interna de la membrana del retículo endoplásmico, con su dominio catalítico direccionado hacia el lumen del mismo en donde existen enzimas generadoras de NADPH, que adicionalmente mantienen un ambiente oxidoreductor adecuado para la correcta actividad reductasa de la isoforma 1 [35;66;90].

Expresión

La 11ßHSD1 se distribuye en forma ubicua en casi todos los tejidos del organismo, entre ellos hígado [25;65;118;136], riñón [25;65;136;141], timo [25;142], bazo [25;142], pulmón [25;65;141-144], glándula adrenal [1;25;118;141;145], páncreas [141], ovario (cuerpo lúteo) [25;65;118;146;147], testículo [25;65;141;146;148], células oculares [25], células estromáticas en los nódulos linfáticos [25], células no epiteliales del colon [25;149], tejido adiposo [25;67;147;150;151], vasculatura (músculo liso) [25;89;118;141;152], epidermis [25], endometrio [25], SNC [8;66;137;139;146;153], placenta y tejidos fetales [65;141;154]. En el SNC existen evidencias de altos niveles en cerebelo, hipocampo, corteza e hipófisis, mientras que la actividad es baja pero detectable en hipotálamo [25;91;118;153;155].

Se han encontrado diferencias en la expresión de la 11ßHSD1 entre especies, por ejemplo existen altos niveles de la misma en túbulo proximal renal de rata y oveja, mientras que se encuentra prácticamente ausente en riñón humano [25;118;141;156]; en testículo de rata los niveles de expresión y actividad son elevados mientras que en testículo de ratón son apenas detectables [25;157].

En cuanto a su expresión en riñón, estudios recientes muestran que la 11ßHSD1, no sólo se expresa en túbulo proximal renal de rata, sino también en células intersticiales de la médula y la papila [25;141]. Las células intersticiales renales secretan agentes hipotensores, poseen receptores para varias sustancias vasoactivas y se encargan de la síntesis de la matriz extracelular. Se cree que la 11ßHSD1 presente en estas células modularía las funciones renales por regulación de la síntesis de los productos secretorios o de determinados receptores. Además, se encontraría estratégicamente localizada de manera adyacente a los túbulos distales que expresan a la isoforma 11ßHSD2, por lo que podría utilizar los 11-ceto glucocorticoides producidos por esta enzima como fuente de sustrato para la síntesis de glucocorticoides activos [141].

Rol fisiológico de la 11ßHSD1 y regulación

Rol fisiológico

La función principal de la 11ßHSD1 es actuar como enzima reactivadora de los glucocorticoides a nivel local, y de esta manera permitir el acceso de los mismos a sus receptores. Para que esta reactivación tenga algún rol fisiológico y no sólo farmacológico, es necesaria la existencia de un pool disponible de 11-cetoesteroides inertes (cortisona en el caso de humanos y 11-dehidrocorticosterona en roedores). La principal fuente de 11-cetoesteroides es la 11ßHSD2 [66;91;158] presente predominantemente, en riñón distal.

Los 11-cetoesteroides tienen la característica de no unirse a proteínas plasmáticas y de poseer un ritmo diurno poco pronunciado [65;66;159]. Por ejemplo, en humanos, la concentración de cortisona circulante es de 50-100 nmol/l mientras que la concentración de cortisol "libre", no unido a proteínas plasmáticas, es de 1 nmol/l durante el nadir diurno, llegando a 100 nmol/l durante el pico diurno o durante una situación de estrés [159]. En la rata, la concentración plasmática de 11-dehidrocorticosterona es también, de aproximadamente 50 nmol/l [65;66]. Así durante cierta parte del día los niveles de cortisona y 11-dehidrocorticosterona circulantes igualan o exceden los niveles de cortisol o corticosterona "libres", con relaciones similares tanto en humanos como en roedores.

Además de la función amplificadora del efecto glucocorticoide observada en la mayoría de los tejidos, una función adicional que se le atribuye a la 11ßHSD1 hepática, es la intervención en la detoxificación de compuestos xenobióticos no esteroides, por reducción carbonílica de los grupos aldehídos, cetónicos y quinónicos, presentes en estos compuestos [25;140;144].

Una excepción a la característica de enzima reactivadora de los glucocorticoides, es la observada para la 11ßHSD1 presente en testículo de rata. En donde estudios *in vivo* e *in vitro* realizados por Monder y col. [25;148;157] demuestran que las células de Leydig poseen actividad 11ß-deshidrogenasa NADP-dependiente. Dichos autores concluyen que, en estas células la 11ßHSD1 actuaría como enzima protectora frente a la inhibición de la síntesis y secreción de testosterona, mediada por el aumento en los

niveles de glucocorticoides como consecuencia del estrés agudo. Frente a una situación de estrés crónico, el exceso de glucocorticoides produciría una saturación de la actividad deshidrogenasa con la supresión consecuente de la secreción y síntesis de andrógenos.

Regulación

Entre los factores que afectan su expresión y actividad se encuentran varias hormonas que actúan de manera tejido- y desarrollo-específico [25;112-114].

En hígado y en cultivos de fibroblastos derivados de piel humana, los glucocorticoides aumentan la actividad de la enzima, siendo este efecto antagonizado por insulina [25;136]. Por otro lado, la administración crónica de dexametasona aumenta la actividad y los niveles del mensajero de la 11ßHSD1 presente en hipocampo y vasculatura, mientras que no posee efecto sobre la 11ßHSD1 presente en hígado y riñón [112;113].

Los esteroides sexuales también regulan, de manera indirecta, a la 11ßHSD1 hepática. Se ha encontrado una menor actividad de la 11ßHSD1 en ratas hembras en comparación con ratas macho, como consecuencia de una supresión de la actividad enzimática por el estradiol, debido a sus efectos sobre el patrón de secreción de la hormona de crecimiento [25;136].

Otros factores que afectan la expresión y/o actividad de la enzima son: IGF-I, algunas citoquinas y la hormona tiroidea, T_3. Esta última produce una disminución en la actividad de la enzima.

La expresión de la 11ßHSD1, presente en las células mesangiales glomerulares, sufre estimulación por interleuquina 1ß (IL-1ß, interleukin 1ß) y por el factor de necrosis tumoral α (TNFα, tumor necrosis factor α). En este caso, se estaría modulando positivamente, el efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides, a nivel glomerular [25].

A pesar de la gran cantidad de información acumulada sobre la regulación de la 11ßHSD1, todavía no queda claro cuál es la importancia fisiológica de cada uno de estos moduladores de la actividad enzimática [66;136].

Evidencias de su acción amplificadora

Hígado

Algunos datos recientes sugieren que la 11ßHSD1 intervendría en la coordinación del control metabólico, promoviendo efectos autócrinos y parácrinos de los glucocorticoides en el hígado [25;66;147]. En este tejido la acción de los glucocorticoides es opuesta a la de la insulina, por ejemplo, aumentan la expresión de la PEPCK, enzima que provee el paso limitante en la gluconeogénesis. El uso de derivados del regaliz que inhiben la actividad de la 11ßHSD1 esta asociado con una reducción en la acción de los glucocorticoides y con un aumento en la sensibilidad a la insulina por los hepatocitos [25;66].

Se han obtenido ratones knock-out para el gen de la 11ßHSD1. Estos ratones se desarrollan normalmente, son viables, fértiles y normotensos. Este modelo muestra que la enzima 11ßHSD1 es principalmente 11ß-reductasa, por lo menos en hígado de ratón, ya que los animales knock-out adrenalectomizados no pueden convertir 11-dehidrocorticosterona exógena en corticosterona activa. Además, poseen hipertrofia e hiperplasia adrenocortical y un incremento tanto en la secreción basal de corticosterona como en la respuesta de la glándula adrenal a ACTH [65]. A pesar que los niveles basales de ACTH y corticosterona plasmáticos están aumentados, estos ratones poseen un fenotipo en donde se evidencia la imposibilidad de regenerar glucocorticoides intracelulares y una reducción en la acción antagonista de la insulina. Por ejemplo, no hay inducción de la PEPCK ni de la Glucosa-6-fosfato durante el ayuno y presentan una baja respuesta hiperglucémica frente a una situación de estrés o frente a la inducción de obesidad debida a una dieta hipercalórica [65;91;160]. Todas estas alteraciones evidencian una deficiencia en la respuesta glucocorticoidea.

Cerebro

En el SNC, los glucocorticoides regulan el desarrollo de las neuronas y también, sus funciones metabólicas y neurotrasmisoras. La exposición crónica a glucocorticoides, produce efectos deletéreos sobre las neuronas, principalmente en aquellas ubicadas en hipocampo y corteza [8;90;91], las cuales poseen altos niveles de expresión de la

11ßHSD1. Estudios realizados en ratones knock-out para esta isoforma, demuestran que la ausencia de la enzima atenúa los efectos deletéreos del exceso crónico de los glucocorticoides sobre las funciones cognitivas [90]. Evidencian, también, que la expresión de la 11ßHSD1 en hipocampo, hipotálamo y pituitaria tendría influencia sobre la regulación de la retroalimentación negativa del eje HHA, ya que estos ratones son menos sensibles a la supresión de la activación del eje HHA por glucocorticoides exógenos [91;160].

Glándula adrenal

Mientras que en humanos, la 11ßHSD1 se encuentra presente en las tres zonas que forman parte de la corteza adrenal [141]; en rata se expresa en gran cantidad en la zona reticularis, más específicamente en la región córtico-medular, en donde optimizaría el envío de glucocorticoides activos desde la corteza hacia la médula adrenal. Se cree que de esta manera cumpliría un papel importante en la regulación de la biosíntesis de catecolaminas mediada por glucocorticoides [1;25;147].

11ßHSD1 y su relación con ciertas enfermedades

Deficiencia aparente en la reducción de cortisona

Este sindrome se ha detectado en pacientes, la mayoría mujeres, que poseen una deficiencia en la conversión periférica de cortisona a cortisol. Los síntomas clínicos aparecen en la adolescencia o comienzos de la adultez, con características de hiperandrogenismo (acné, hirsurtismo, infertilidad) [25].

Existe un incremento en los niveles de andrógenos circulantes, los cuales pueden ser rápidamente suprimidos por la administración de dexametasona. Hay un aumento en la excreción de metabolitos del cortisol, indicando un incremento en la tasa de secreción del mismo. La necesidad de mantener niveles normales de cortisol circulante, lleva a un aumento en la secreción de ACTH a expensas de un exceso en la secreción de andrógenos.

Si bien, aún no se han detectado mutaciones en el gen de la 11ßHSD1 en estos pacientes, sería un posible candidato debido a la deficiencia en la conversión de

cortisona a cortisol [25].

Obesidad

En un modelo animal de rata obesa resistente a leptina, se han encontrado cambios tejido-específicos en la metabolización de glucocorticoides. Mientras que la actividad 11ßHSD1 se encuentra disminuida en el hígado de estas ratas obesas, hay un aumento en la reactivación de corticosterona por la 11ßHSD1 presente en tejido adiposo. El aumento de glucocorticoides activos en tejido adiposo contribuiría al fenotipo obeso [150;161].

Este efecto bifásico de regulación de la 11ßHSD1 y, en consecuencia, de los niveles de glucocorticoides activos, también ha sido observado en pacientes con obesidad primaria [67;150;151].

Además, de la disminución en la reactivación de corticosterona en hígado, existe un aumento de su eliminación en los animales obesos (lo mismo ocurre en humanos obesos), debido a un incremento de la actividad 5α-reductasa. Esta disminución de los niveles circulantes de glucocorticoides activos atenúa las consecuencias metabólicas intrahepáticas de la obesidad (activación de las enzimas gluconeogénicas). Sin embargo, por otro lado, provoca una activación compensatoria del eje HHA debido a la reducida regeneración hepática

1.4.3. LA 11ß-HIDROXIESTERÓIDE DESHIDROGENASA 2

Generalidades

La 11ßHSD2 dependiente de NAD^+, posee una afinidad elevada por el cortisol y la corticosterona (100 veces más elevadas que las observadas para la 11ßHSD1). La corticosterona es el sustrato preferido por la enzima, su afinidad es 10 veces mayor para corticosterona que para cortisol, incluyendo a los mamíferos en donde el cortisol es el glucocorticoide predominante. Los valores de K_M reportados varían entre 0,7-26 nM para corticosterona y 17-55 nM para cortisol [25;71;135].

La enzima posee un peso molecular de 40.000 y es, exclusivamente, una 11ß-deshidrogenasa, cataliza la conversión de los glucocorticoides activos a cortisona y 11-dehidrocorticosterona, que son inactivos (Figura 1.4.1.). Sin embargo, en el caso del glucocorticoide sintético dexametasona, actúa como una enzima reversible interconvirtiendo 11-dehidrodexametasona nuevamente a dexametasona [25;118;135;140;162].

Al igual que la isoforma tipo 1 es una enzima microsomal, que se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico a través de su dominio N-terminal hidrofóbico, pero a diferencia de la 11ßHSD1, su motivo catalítico protruye hacia el citoplasma [35;129;163].

Cuando la 11ßHSD2 colocaliza con el receptor a mineralocorticoides asegura el acceso selectivo de aldosterona, la cual constituye un pobre sustrato para la enzima debido a que, en solución, se encuentra en equilibrio tautomérico con diversas formas cíclicas (Figura 1.4.2.) [71].

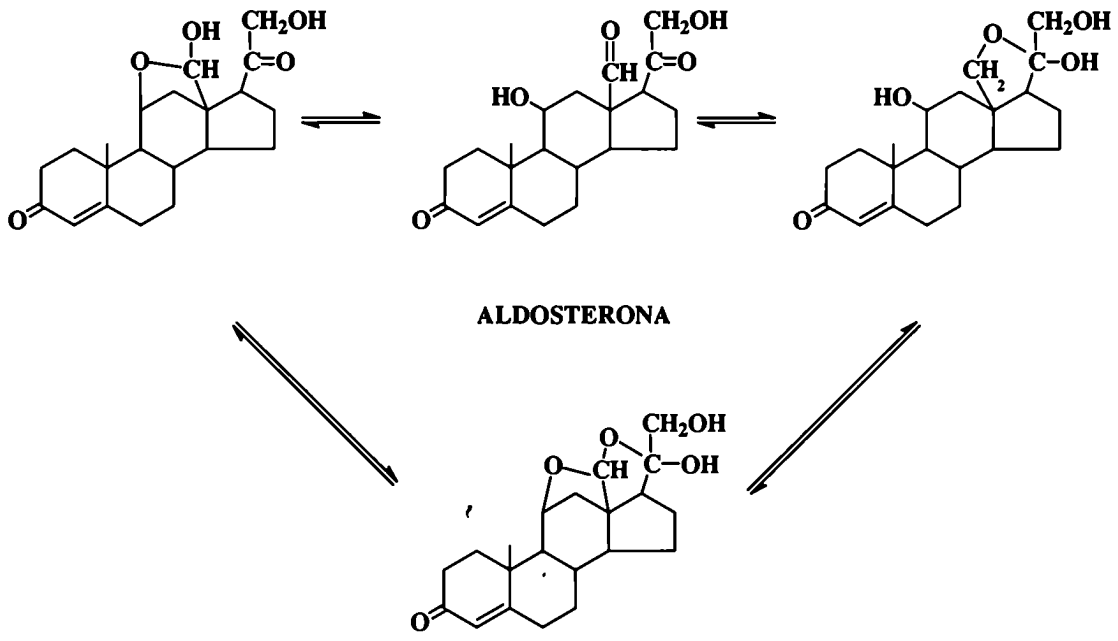


Figura 1.4.2. *Formas cíclicas de aldosterona*

Expresión y rol fisiológico

En comparación con la isoforma 1, su expresión se encuentra más restringida. Se ubica en todos los tejidos blanco de aldosterona [129;164;165] como son nefrón distal, donde colocaliza con los receptores a mineralocorticoides y a glucocorticoides [25;44;166], epitelio distal de colon [25;94;165;166], intestino delgado [156;165], glándula mamaria [167;168] y conductos de la glándula sudorípara [25;95;142;165;169]. También se ha detectado expresión de la enzima en páncreas [156;166], pulmón [25;164;170], ovario (células de la teca y de la granulosa) [25;146;147;149], piel [25;165] y en cardiomiocitos [96;97].

En el riñón, permite el acceso de aldosterona al MR y evita la sobreestimulación del MR por los 11ß-hidroxiglucocorticoides, la cual llevaría a un exceso en la reabsorción de sodio y en la eliminación de potasio a nivel distal [25;44;118].

Se ha demostrado expresión de la 11ßHSD2 en células humanas del músculo liso vascular [152;171] y en células endoteliales de rata [171]. Allí, tanto los glucocorticoides como los mineralocorticoides, aumentan el tono vascular por incremento del número de receptores a AII [152]. La ausencia de actividad 11ßHSD2, produce un aumento del tono vascular debido a que el cortisol, por un lado, activa al MR y, por otro lado, inhibe la síntesis de óxido nítrico que trae como consecuencia un incremento de la contractilidad mediada por norepinefrina [89;152;171].

La 11ßHSD2 también se expresa en corteza adrenal (principalmente en la zona fasciculata) en donde intervendría en la inactivación de los glucocorticoides recién formados [1;25;145;149;164;172;173]. Se ha observado inhibición de su actividad por ACTH y AII [118;172]. Un incremento en la concentración local adrenal de hormonas esteroideas (cortisol y corticosterona), como ocurre en el sindrome de Cushing producido por adenomas adrenales, lleva a la saturación de la actividad enzimática con el consecuente efecto mineralocorticoide mediado por el cortisol [25;173].

En SNC fetal y neonatal existe alta expresión de la enzima, la cual podría modular los efectos de los glucocorticoides durante el desarrollo [153]. Su expresión baja drásticamente durante el último trimestre, excepto en tálamo y cerebelo [45], y se encuentra prácticamente ausente del cerebro adulto, salvo por la expresión en algunos

sitios apropiados para producir efectos centrales selectivos de aldosterona como son el aumento de la presión arterial (núcleo del tracto solitario), la homeostasis del sodio y el apetito salino (hipotálamo, órgano subcomisural y núcleo central de amígdala) [8;91;149;164;174]. En todos estos sitios colocaliza con el MR [25].

En glándula mamaria, la enzima 11ßHSD2 posee un rol fisiológico importante durante la preñez y la lactancia, en este período tanto la enzima como el MR están presentes, y se cree que intervienen en la modulación del transporte iónico durante la producción de la leche. También se postula que la actividad de la 11ßHSD2 podría prevenir la producción prematura de leche por decrecimiento de las concentraciones locales de glucocorticoides [25;167;168].

Existen altos niveles de expresión en unos pocos tejidos que no son blanco de los mineralocorticoides, por ejemplo en glándula tiroides en humanos [156], en arteriolas de la piel humana [95;118;165], endometrio [25;175] y, en placenta y tejidos fetales [25;118;149;154;176]. En este último caso, la 11ßHSD2 posee una expresión diferencial respecto de 11ßHSD1 y se cree que en placenta actuaría, por un lado, como enzima protectora del feto frente al exceso de glucocorticoides maternos, y por otro lado estaría involucrada en la regulación del intercambio de agua y electrolitos entre la madre y el feto [25;44;177].

Una deficiencia en la 11ßHSD2 placentaria permitiría que los altos niveles de glucocorticoides atravesaran la placenta, inhibiendo el crecimiento fetal. En humanos el bajo peso al nacer es un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión durante la vida adulta [156].

Regulación

La 11ßHSD2 exhibe inhibición por producto del tipo no competitiva, con una concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática para 200 nM de 11-dehidrocorticosterona [25;178].

Tanto la actividad de la isoforma 2, como la de la isoforma 1, puede ser inhibida por la ingestión de regaliz, el cual contiene ácido glicirretínico, un potente inhibidor de la actividad 11ßHSD [179-181]. Además de ejercer una inhibición competitiva sobre

ambas isoformas, el ácido glicirretínico, también produce disminución de los niveles de mensajero de la 11ßHSD1 [25].

Concentraciones elevadas de inhibidores de la 11ßHSD2 endógenos como algunos ácidos biliares [35;182]; deoxicorticosterona [135] y metabolitos de la progesterona 11-hidroxilados [25;135;183;184], o la ingestión de inhibidores exógenos como el ácido glicirretínico, su metabolito carbenexolona [179-181], flavonoides presentes en el jugo del pomelo [35] y la droga diurética furosamida [35;185;186], correlacionan con la actividad del MR inducida por glucocorticoides [94;108;139]. Recientemente se ha sugerido la existencia, en plasma, de inhibidores endógenos de la actividad 11ßHSD, llamados Factores Similares al Acido Glicirretínico (GALFs, glycyrrhetinic acid-like factors). Se han detectado GALFs en orina humana y, en grandes cantidades, en mujeres embarazadas y en pacientes con hipertensión esencial, pero aún no se conoce la identidad de estos factores aunque se sospecha que un candidato podría ser la 11-hidroxiprogesterona [25;108;135;156;178].

Es poco lo que se sabe sobre los efectos de las hormonas corticoides, y la escasa información con la que se cuenta es bastante contradictoria. Así por ejemplo, mientras que Alfaidy y colaboradores [187] no pudieron hallar modificaciones en la actividad 11ßHSD2 en animales adrenalectomizados inyectados en forma aguda o crónica con aldosterona, corticosterona o dexametasona; Li y colaboradores [111] encontraron un incremento en la actividad de la 11ßHSD2 renal en ratas que habían sido inyectadas crónicamente con dexametasona o deoxicorticosterona, junto con una disminución en los niveles de su mensajero. Por otro lado, Diederich y col. [188] observaron una inhibición, concentración dependiente, de la actividad enzimática mediada por glucocorticoides, en cortes de riñón humano.

No sólo las hormonas corticoides parecen regular la actividad y abundancia de la 11ßHSD2, sino también las hormonas sexuales (progesterona y estradiol) y EGF. Estudios realizados a partir de una línea celular derivada de endometrio, han demostrado que tanto los glucocorticoides (naturales o sintéticos) como las hormonas sexuales producen un aumento de la actividad 11ßHSD2, por aumento de los niveles de su mensajero; mientras que el EGF, produce el efecto contrario sobre la 11ßHSD2 [175].

Los estrógenos aumentan la actividad de la 11ßHSD2 renal, mientras que una disminución del pH o el estado de acidosis metabólica en el que se podría encontrar el organismo, producen una disminución de la actividad de esta enzima a nivel renal [25;189].

Se ha demostrado la intervención de la proteína quinasa A (PKA, protein-kinase cAMP-dependent) en la regulación de la 11ßHSD2, la hormona AVP o el AMPc estimulan la actividad de la misma *in vitro*, en túbulo colector cortical [190]. Este aumento de actividad requiere de aldosterona, ya que el efecto sólo se observa en túbulos de animales intactos o de animales adrenalectomizados que recibieron aldosterona exógena [190]. Es decir, que las dos hormonas principales involucradas en la regulación fina de la reabsorción renal de sodio - aldosterona y AVP- estarían actuando de manera coordinada para aumentar la actividad de la 11ßHSD2 y en consecuencia, aumentar la actividad mineralocorticoide.

El sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides y la hipertensión inducida por intoxicación con regaliz

Sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides tipo I y II

El sindrome de AME es una forma severa de hipertensión infantil producida por la ausencia de actividad 11ßHSD2. Puede ser clasificado en congénito o adquirido, de acuerdo a la causa que lo origina, donde el sindrome congénito se subdivide en tipo I y tipo II [25;30;191].

Fue descripto por primera vez en 1974 por Werder y colaboradores y luego caracterizado bioquímicamente por New y Ulick a fines de los años '70 [156;191;192]. Hasta el momento se han encontrado aproximadamente 50 casos diferentes en el mundo. Los síntomas y signos clínicos típicos de AME incluyen una severa hipertensión dependiente de sal, aumento en la excreción de potasio, hipoaldosteronemia y supresión de la actividad de renina plasmática (debido a la inhibición del sistema renina-angiotensina). También se observa disminución del peso al nacer, baja estatura, poliuria y subdesarrollo de la masa ósea debido a una asociación con nefrocalcinosis [25;82;94;133;156;191].

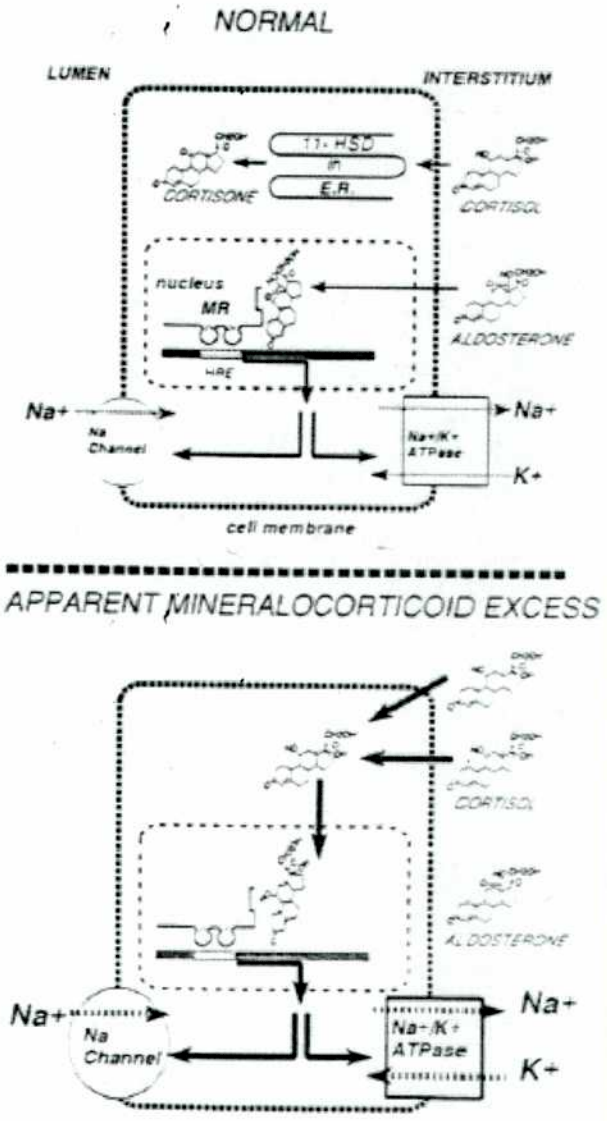


Figura 1.4.3. *Esquema de la acción mineralocorticoide.* (**Arriba**) Célula renal normal, blanco de mineralocorticoides. Aldosterona ocupa al MR, el cual se une a los elementos de respuesta hormonal presentes en el ADN, regula la transcripción de genes, y directa o indirectamente aumenta la actividad de los canales de sodio apicales (Na^+) y de la bomba sodio/protón ATPasa (Na^+/K^+). En consecuencia, se produce un aumento en la reabsorción de sodio y en la eliminación de potasio hacia el lumen tubular. El cortisol, que circula a niveles más elevados que la aldosterona, no puede ocupar al MR, debido a la presencia de la 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11-HSD). (**Abajo**) Célula de un paciente con el sindrome de aparente exceso de mineralocorticoides. Debido a la ausencia de la 11-HSD, el cortisol ocupa al MR, llevando a un aumento en la actividad de los canales de sodio y de la bomba Na^+/K^+, con la consecuente hipertensión arterial (*Esquema extraído de cita [71]).*

El sindrome congénito se hereda de manera autosómica recesiva y su patogenia es un defecto en la conversión periférica de cortisol a cortisona, que trae como consecuencia un incremento en la vida media del cortisol plasmático, reflejando una deficiencia de la actividad 11ßHSD. Esta disminución en la metabolización del cortisol, está causada por mutaciones en el gen *HSD11K* que codifica para la enzima 11ßHSD2. La falta o, en algunos casos, disminución de la actividad enzimática resulta en un exceso de cortisol que accede y activa al MR (Figura 1.4.3.) [30;94;140;156].

El sindrome de AME, es uno de los tantos ejemplos de hipertensiones causadas por la mutación de un único gen, y por ello son llamadas hipertensiones "monogénicas", las cuales afectan directamente la presión sanguínea a través de una acción directa o indirecta sobre el transporte de sodio [25].

Se han encontrado más de 15 mutaciones diferentes en el gen *HSD11K*. Todas éstas afectan la actividad enzimática o el splicing del pre-mRNA (Figura 1.4.4.). Salvo por dos excepciones en donde cada alelo del gen presenta una mutación diferente, todas estas mutaciones se encuentran en estado homocigota [25;71;193].

El perfil de los esteroides urinarios en pacientes con AME tipo I, se caracteriza por el incremento relativo en la excreción de metabolitos del cortisol con el anillo A reducido, tetrahidrocortisol y 5α-tetrahidrocortisol (THF, 5α-THF), mientras que los metabolitos de cortisona con el anillo A reducido, tetrahidrocortisona (THE), son muy bajos (Figura 1.4.5.). La relación (THF + 5α-THF)/THE en personas normales es cercano a 1, mientras que esta relación llega a valores entre 6 y 50, en personas con AME tipo I [94;156;194].

Además, la excreción de los metabolitos del cortisol 5α-reducidos (5α-THF) excede la de los 5ß-reducidos (THF), obteniéndose una relación urinaria 5α-THF/THF muy alta, hecho que sugiere una deficiencia adicional en la actividad 5ß-reductasa [25;94;156;191].

A pesar de este defecto en la conversión de cortisol a cortisona en los pacientes con el sindrome de AME, estos no son Cushingoides debido a que las funciones de regulación negativa de los glucocorticoides se mantienen normales, hecho que lleva a que los niveles de cortisol circulantes se mantengan dentro del rango fisiológico normal [25].

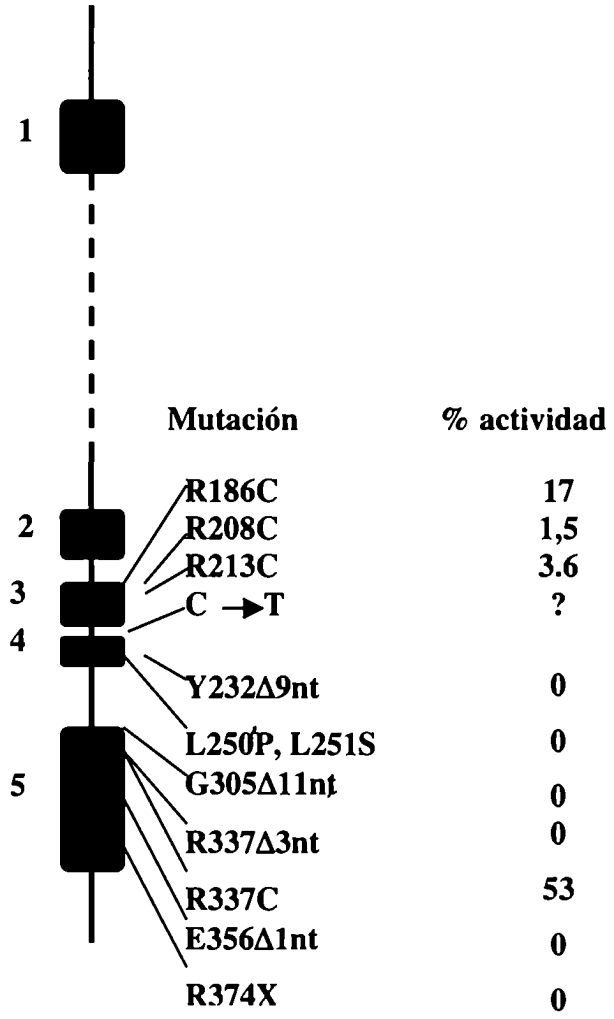


Figura 1.4.4. Esquema del gen *HSD11K* y la localización de las mutaciones que causan el sindrome de Aparente Exceso de Mineralocorticoides. Se incluye el porcentaje de actividad residual asociada a cada mutación (*Esquema extraído de cita [71]*).

Los síntomas, producidos por una disminución en la actividad 11ßHSD2, pueden ser parcial o totalmente revertidos con una dieta baja en sodio junto con la utilización de un bloqueante del MR como es la espironolactona, sin embargo se

requieren dosis altas de este antagonista para que compita con el cortisol por el MR. En algunos casos la administración conjunta de ACTH exacerba los efectos de la espironolactona [25;44;94]. Algunos pacientes responden mejor con amilorida (inhibidor de los canales de sodio), con inhibidores de la enzima de conversión o con dexametasona, que suprime la secreción de glucocorticoides a nivel del sistema nervioso central [25;94;156;191].

Ratones knock-out para esta enzima evidencian el mismo fenotipo que pacientes con AME tipo I, es decir alta excreción de potasio e hipertensión. Además presentan un aumento de la mortalidad neonatal (alrededor del 50%) asociada con una marcada distensión colónica producida por la hipopotasemia, hipertrofia e hiperplasia del epitelio tubular distal [65;156;195].

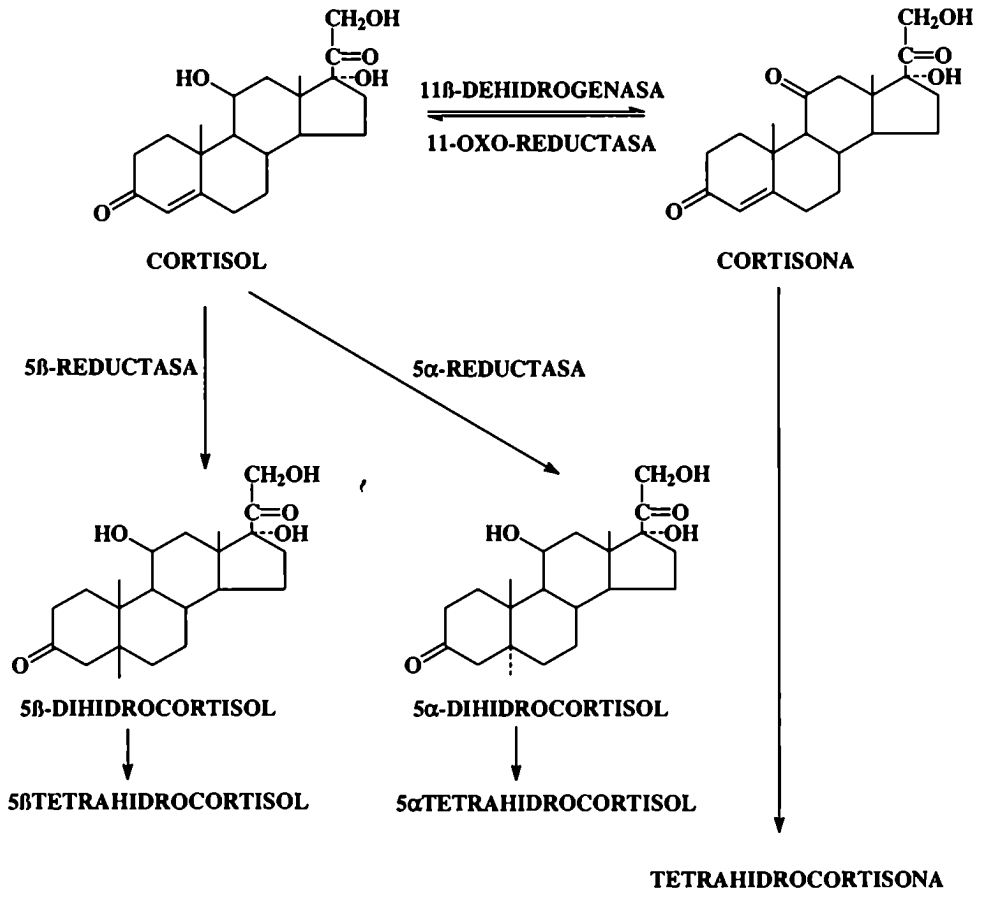


Figura 1.4.5. *Ruta de metabolización de los glucocorticoides.*

Dependiendo del grado de pérdida de actividad enzimática, las mutaciones en el gen *HSD11K* pueden causar un espectro de hipertensiones que van desde muy severas con muerte en la niñez, hasta muy leves, en donde sólo se detecta en el individuo adulto [115]. Por ejemplo, en el sindrome llamado AME tipo II, la relación urinaria (THF + 5α-THF)/THE se encuentra, sólo levemente aumentada; sin embargo, la vida media del cortisol plasmático se encuentra incrementada al igual que en el sindrome clásico [25;94;156;191;194;196]. El análisis molecular de pacientes con AME tipo II, reveló la presencia de mutaciones en el gen *HSD11K*. La expresión *in vitro* de esta enzima mutante mostró una afinidad por el cortisol idéntica a la enzima normal, mientras que la Vmax se había reducido en un 35% [156].

Hipertensión producida por regaliz.

El regaliz es un extracto dulce que se obtiene a partir de la raíz de una planta denominada *Glycyrrhiza glabra*, y que ha sido muy utilizado como extracto saborizante y como remedio homeopático por milenios [25;29;108]. El componente activo del regaliz es el ácido glicirretínico y su derivado hemisuccinato, la carbenexolona (Figura 1.4.6.), siendo esta última una eficiente droga antiúlcera.

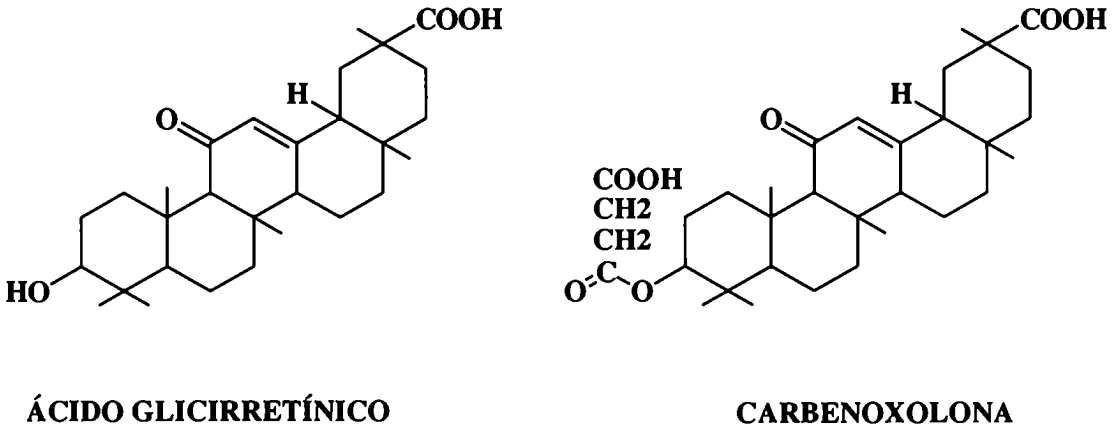


Figura 1.4.6. *Estructura química del ácido glicirretínico y su derivado la carbenoxolona.* Ambos compuestos son potentes inhibidores de la actividad 11ßHSD.

Cuando el regaliz o la carbenexolona son administrados terapéuticamente, cuando se ingieren habitualmente, o cuando se da regaliz a voluntarios sanos, el sindrome resultante comparte la mayoría de las características clínicas y bioquímicas del AME [25]. Las manifestaciones clínicas incluyen, disminución en la secreción de metabolitos de la cortisona, incremento en la excreción urinaria de cortisol libre, aumento en la reabsorción de sodio, hipopotasemia y aumento de la presión arterial. Debido a la excesiva activación de los MR en nefrón distal existe una supresión de la actividad de renina plasmática [25;71;82;94;191;194].

La explicación a estos síntomas esta dada, en parte, por la inhibición competitiva de la actividad 11ßHSD, la cual conduce a una forma adquirida de AME tipo I. Sin embargo, es importante recalcar que estos compuestos inhiben, también a otras enzimas, incluidas la 5ß-reductasa (Figura 1.4.5.), 3ß-deshidrogenasa y 17ß-deshidrogenasa [29;108]. Por lo tanto, no se pueden asignar los efectos biológicos del regaliz exclusivamente a la inhibición de la 11ßHSD.

Este sindrome adquirido, responde a espironolactona y es reversible a los pocos días de haberse dejado de consumir el regaliz [25;71;94;191].

11ßHSD2 y su relación con la hipertensión esencial

En la población en general, la hipertensión tiene una prevalencia de un 20-30%. El término de hipertensión "esencial" se utiliza para nombrar a aproximadamente el 95% de los casos de hipertensión en los cuales no se conocen las causas que llevan a un aumento de la presión arterial.

Estudios recientes han mostrado que algunos pacientes con hipertensión esencial poseen una vida media del cortisol incrementada, un aumento en orina de los metabolitos del cortisol y una respuesta vasoconstrictora exacerbada debida al efecto de los glucocorticoides [94;156;197;198], sugiriendo que la 11ßHSD2 podría estar involucrada en algunos casos de hipertensión esencial.

11ßHSD2 y su relación con ciertas enfermedades

Sindrome ACTH ectópico

El 80% de los pacientes con sindrome de Cushing sufren de hipertensión. Este porcentaje se incrementa por arriba del 95% si sólo se considera al subgrupo de pacientes con el sindrome de ACTH ectópico. Uno de los factores que caracteriza a este sindrome, es el aparente exceso de mineralocorticoides, generado por una saturación de la actividad 11ßHSD2 debido a las altas concentraciones de cortisol circulante [25;68;94;194;199].

Cáncer

Existen evidencias de la expresión de 11ßHSD2 en células cancerosas [118;155;200-202]. Se ha visto que los glucocorticoides inhiben la proliferación celular en algunos tipos de cáncer, sugiriendo que la inhibición de la actividad de la 11ßHSD2 podría retardar el crecimiento tumoral.

Estudios *in vitro* realizados con células derivadas de cáncer de mama (MCFZ y ZR-75-1) han mostrado que la inhibición de la actividad de la enzima exacerba los efectos antiproliferativos de los glucocorticoides [118].

1.4.4. ESTRUCTURA GENÉTICA Y PROTEICA DE LAS HIDROXIESTEROIDES DESHIDROGENASAS

Ambas isoformas, 11ßHSD1 y 11ßHSD2, comparten sólo un 14% de identidad entre ellas, sin embargo pertenecen a una misma superfamilia de proteínas, la de alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SCAD, short-chain alcohol dehydrogenases), también conocida como deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR, short-chain deshidrogenases/reductases). Esta superfamilia incluye más de 100 miembros de origen procariota y eucariota, que actúan sobre sustratos tan diversos como son los azúcares, esteroides, prostaglandinas, hidrocarburos aromáticos y compuestos involucrados en el metabolismo del nitrógeno [25;118;203].

A pesar de que las enzimas pertenecientes a esta superfamilia sólo poseen once residuos aminoacídicos completamente conservados entre ellas, existe una estructura terciaria superimpuesta muy conservada, al igual que un mecanismo de reacción consensuado [133;140].

En cuanto a su estructura terciaria, la mayor similitud se observa en el dominio de unión al cofactor, mientras que existe una gran divergencia en la mitad carboxi-terminal, que refleja la diversidad de sustrato (Figura 1.4.7.) [25;144;203].

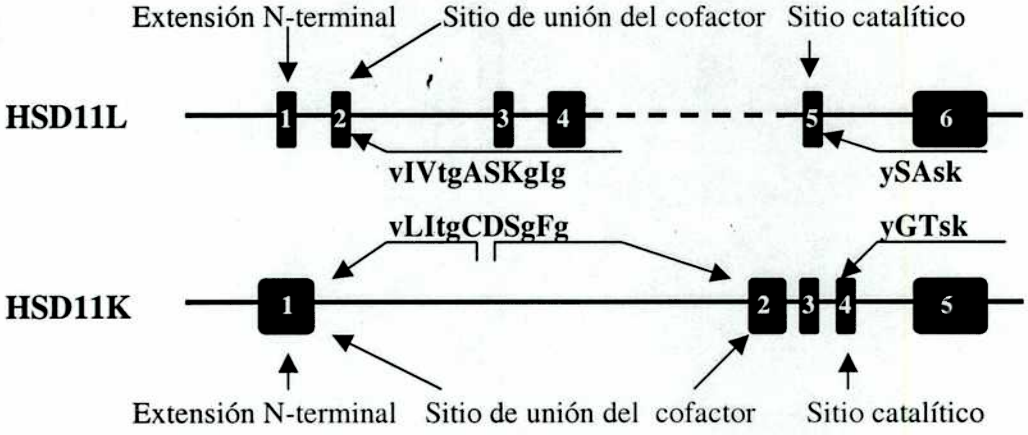


Figura 1.4.7. *Esquema de los genes que codifican para las isoenzimas 11ßHSDs.* Los números en las cajas negras representan los exones. Se encuentran indicados aquellos exones que codifican para dominios de importancia funcional. Se muestran las regiones de aminoácidos que se encuentran altamente conservadas; los residuos aminoacídicos idénticos se presentan en letra minúscula. HSD11L, gen que codifica para la 11ßHSD1; HSD11K, gen que codifica para lá 11ßHSD2 (*Esquema extraído de cita [71]*).

Estudios recientes llevados a cabo por el grupo de Gómez-Sánchez, han demostrado que la 11ßHSD2 puede existir como un monómero activo o como dímero inactivo [204]. Este dímero inactivo sería una excepción a la regla, en donde la mayoría de las enzimas pertenecientes a la superfamilia SCAD existen como dímeros o tetrámeros activos. En el caso de existir regulación del equilibrio dímero-monómero de la 11ßHSD2, ésta cumpliría la función de modular la actividad enzimática e,

indirectamente, la actividad glucocorticoide y mineralocorticoide a nivel local [204].

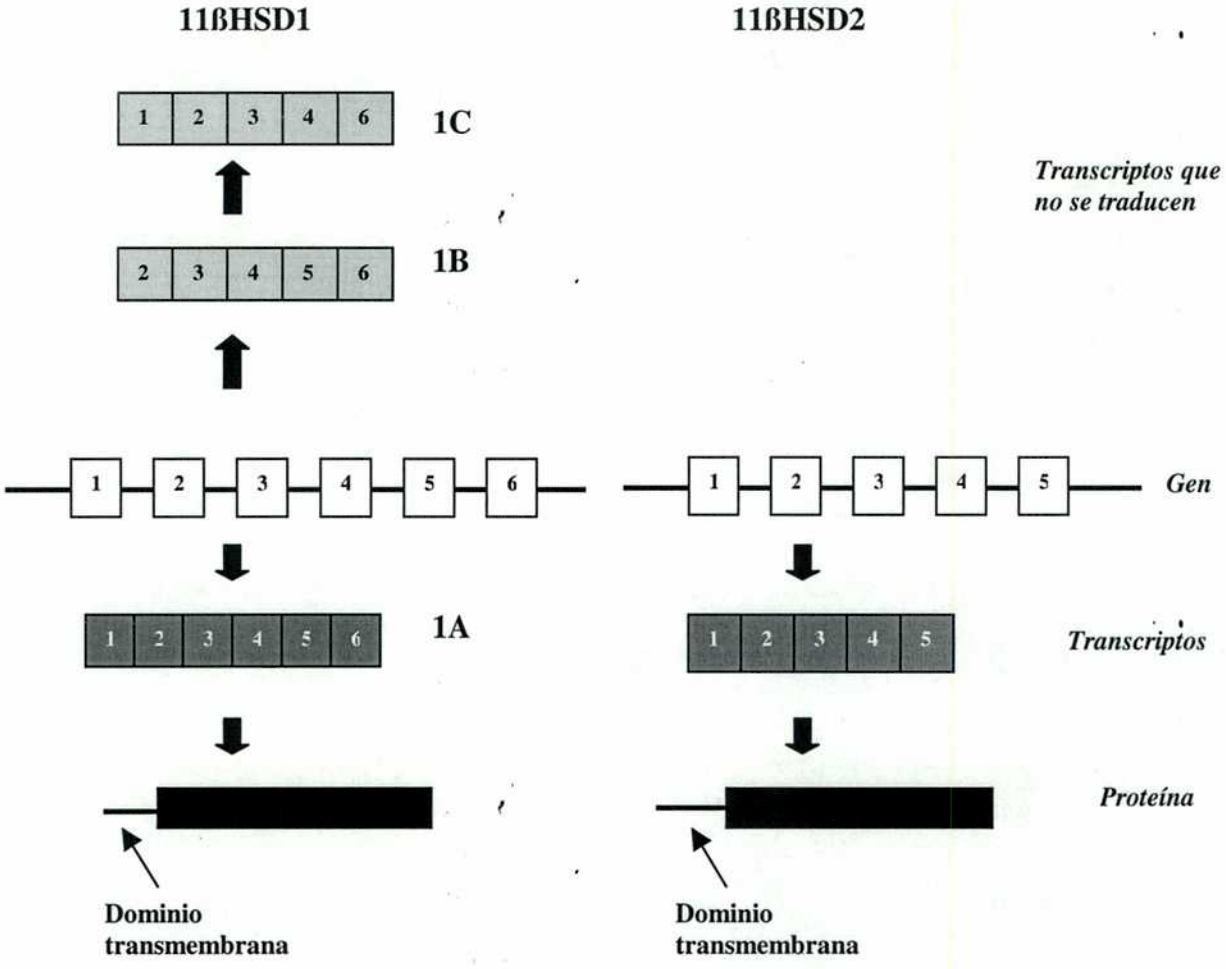


Figura 1.4.8. *Organización genómica de los genes humanos para las isoformas 11ßHSD1 y 11ßHSD2.* La utilización de diferentes promotores y el splicing alternativo, dan origen a tres formas de la 11ßHSD1, en vertebrados (1A, 1B y 1C). No se han encontrado productos traducidos derivados de los transcriptos 11ßHSD-1B y 11ßHSD-1C. No se ha detectado splicing alternativo para la isoforma 11ßHSD2 (*Esquema extraído de cita [140]*).

El gen de la 11ßHSD1 humana (*HSD11L*) [140] esta ubicado en el cromosoma 1 y posee 6 exones que abarcan 9 kb. El gen de la 11ßHSD2 humana (*HSD11K*) posee 5 exones que abarcan 6,2 kb y se encuentra localizado en el cromosoma 16 (Figura

1.4.7.).

La 11ßHSD1 posee splicing alternativo y utilización diferencial de promotores, que dan origen a tres productos distintos, tejido-específicos: 11ßHSD-1A, B y C, sólo 1A se traduce a la forma enzimáticamente activa (Figura 1.4.8.).

El gen de la 11ßHSD2 posee dos sitios tejido-específicos de iniciación de la transcripción.

11ßHSD1A posee un sitio de N-glicosilación mientras que no se ha detectado este tipo de modificaciones en 11ßHSD2, a pesar de la existencia, en su estructura primaria, de un sitio putativo de glicosilación.

1.5. ESTRÉS

1.5.1. HISTORIA: EL CONCEPTO DE ESTRÉS

A mediados de los años `30 Selye introduce y populariza, en el ámbito tanto clínico como científico, el concepto de "stress" como un "sindrome" producido por diversos agentes nocivos. La elaboración de su teoría sobre el estrés, publicada en la revista Nature en 1936, describe una cierta patología común (agrandamiento de la glándula adrenal, úlceras gastrointestinales e involución del tejido linfático y el timo) producida por una gran variedad de agentes "estresores". Consideró al estrés como una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda, incluyendo infecciones, traumas severos, presencia de toxinas, exposición a radiación, operaciones quirúrgicas, exposición al frío y ejercicio muscular [5;205].

Selye focalizó su atención en el eje HHA como el circuito efector clave de la respuesta frente al estrés, y propuso que la mayoría de los estímulos estresores inducían dos tipos de respuesta: 1) una respuesta general, que era común a todos los tipos de estrés e involucraba la liberación de ACTH y de glucocorticoides adrenales y 2) una respuesta individual mediada por "factores condicionantes" como la predisposición genética [5;205].

Cannon, fue el primero en hablar de especificidad en la respuesta del organismo frente al estrés. Fue quien consideró al sistema nervioso simpático como un sistema homeostático esencial, para la restauración de la homeostasis perdida y para la supervivencia del organismo ante una situación de estrés [5;205;206].

Si bien la teoría del estrés de Selye, no negaba la existencia de patrones de respuesta específicos, dependiendo del agente estresor; enfatizaba que dichas respuestas no constituían parte del estrés. Cannon, desde una perspectiva evolucionista, reconoció que la respuesta no específica del estrés, no podía proveer de ventaja adaptativa frente a la selección natural y, que de ser realmente una respuesta inespecífica, nunca hubiera evolucionado [205].

Por otro lado, algunos investigadores, entre ellos Mason, observaron que en

respuesta a diferentes agentes estresores, la actividad del eje HHA podía aumentar, disminuir o incluso mantenerse sin cambios y, reconocieron la importancia de los aspectos emocionales, como la ansiedad y el miedo, en la respuesta al estrés [205;207;208].

En 1998, McEwen introduce el concepto de "allostasis" en los estudios sobre el estrés y define a este término comb la habilidad de mantener la estabilidad del medio interno a través del cambio [205;209]. Allostasis, se refiere al proceso activo de adaptación por producción de distintos mediadores como son los esteroides adrenales, las catecolaminas, las citoquinas, los mediadores tisulares y los genes tempranos [2;3;205]. Luego de la exposición a una situación de estrés crónico, se inician las respuestas fisiológicas que conducen a respuestas allostáticas (adaptativas), si las respuestas allostáticas son eficientes, ocurre la adaptación y el organismo se protege frente al daño. En situaciones donde la respuesta allostática es prolongada, inadecuada o sobreestimulada por repetidos agentes estresores, la carga allostática resulta en una mala adaptación con el consecuente daño de órganos [205;209].

Muchos de los efectos adversos, generados por el estrés, se observan en distintas regiones del cerebro, especialmente en el hipocampo, región involucrada con determinados procesos cognitivos como la memoria y con la regulación del eje HHA [3;205]. La exposición prolongada a altos niveles de glucocorticoides, como ocurre en el estrés crónico, causa cambios conductales, neuroquímicos y neurodegenerativos, modificaciones de la actividad eléctrica del hipocampo, y atrofia dendrítica y neuronal [90;91;205;210].

En oposición a los cambios neurodegenerativos, los glucocorticoides también conducen a respuestas neuroprotectoras durante el estrés, por ejemplo, aumentan la expresión de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y de la neurotropina-3, marcadores que promueven la sobrevida oligodendrocítica en respuesta a altos niveles de glucocorticoides [205;211].

Desde la acuñación del concepto de estrés por Selye, hasta la fecha, se ha tratado de elaborar una única teoría que intente definir el concepto de estrés, pero ninguna de las existentes hasta el momento ha sido ampliamente aceptada por la comunidad

científica, debido, principalmente, a que estrés no puede ser cuantificado, ni los mecanismos a través de cuales ejerce su respuesta, completamente dilucidados.

Investigadores como Weiner, Chrousos y Gold han contribuido de manera decisiva al respecto, estableciendo evidencias de la especificidad de la respuesta del organismo frente al estrés y, presentando a los agentes estresores, como presiones selectivas fisiológicas y del medio ambiente social, que desafían al ser vivo y producen patrones de respuesta compensatorios [2;114;205;207;212].

La gran cantidad de artículos que han sido escritos sobre el estrés y enfermedades relacionadas, si bien no han logrado llegar a un consenso científicamente aceptado en cuanto a la definición de estrés, sí han permitido establecer la especificidad de la respuesta frente a un determinado agente estresor, en donde diferentes agentes producen distintas respuestas neurales y endócrinas [205;213-218].

1.5.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL ESTRÉS

El agente estresor, puede ser visto como un estímulo que altera la homeostasis. En términos de duración, los agentes estresores pueden ser divididos en agudos y crónicos. Durante la respuesta a un estrés agudo, los procesos fisiológicos son importantes para redireccionar la utilización de energía entre ciertos órganos y, selectivamente, inhibir o estimular la movilización de las reservas energéticas [2;3;24;205].

Normalmente, luego de la exposición a un agente estresor, ciertos tejidos tienden a reducir su consumo de energía mientras que otros, especialmente aquellos que son importantes para la actividad locomotora, reciben suficientes nutrientes para funcionar correctamente. El SNC, también tiene prioridad durante la respuesta al estrés y recibe preferencialmente, una cantidad suficiente de nutrientes desde la circulación [2;3;4;6;205]. El incremento en el suplemento de energía hacia los órganos "cruciales" es llevada a cabo, principalmente, por la liberación de catecolaminas y de glucocorticoides que, en general, incrementan la gluconeogénesis, inhiben la captación de glucosa y aumentan la proteólisis y lipólisis [2;6;205].

Existe un gran número de factores que determinarán si el individuo podrá, efectivamente, hacer frente a un agente estresor en particular. Uno de ellos es la respuesta neuroendócrina, ya que sin esta respuesta el organismo tendrá pocas probabilidades de sobrevivir frente a una situación de estrés. Una característica importante del éxito en hacer frente al estrés es, que los sistemas fisiológicos involucrados no sólo tienen que activarse eficientemente sino que también deben poder desactivarse luego de que el estrés ha cesado. Así, cuando estos sistemas (por ejemplo el sistema neuroendócrino) no son rápidamente movilizados y luego apropiadamente reducidos, el aumento en los niveles hormonales se torna peligroso para el organismo, resultando en distintas enfermedades relacionadas con el estrés (hipertensión, derrames cerebrales, diabetes, obesidad, desórdenes autoinmunes e inflamatorios, etc.) [5;23;157;161;205] . La habilidad que cada individuo posee para hacer frente a una situación estresante en particular, varía, y estas diferencias son producto de la genética del individuo, de influencias durante su desarrollo, de la experiencia, del entrenamiento, del apoyo social y de la salud física y mental [205].

Sistemas involucrados en el estrés

El denominado sistema estrés está integrado por un mecanismo de defensa dirigido contra la agresión a la que puede estar sujeto el organismo. Se encuentra formado por:

1) El eje Hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA), el cual se encuentra rigurosamente controlado por estímulos que llegan al hipocampo y por terminaciones noradrenérgicas originadas en el Locus Coeruleus [2-4;6;8;205;216;219;220].
2) El sistema Simpático-Adrenomedular (SAM) [2-4;216].
3) El sistema Simpático-Neural [3;216].
4) El sistema Inmune [3;4;221].

Estos cuatro sistemas actúan en conjunto para mantener la homeostasis del organismo durante una situación de estrés.

La corteza adrenal es el sitio de encuentro de los componentes neural, inmunológico y endócrino del sistema de respuesta al estrés y es por eso, que juega un rol crucial en la defensa del organismo.

En el hipotálamo, CRH determina tanto la función del eje HHA como la del sistema autónomo (simpático-adrenomedular y simpático-neural); su síntesis y secreción se encuentra bajo la regulación de varios neuropéptidos y neurotransmisores [216;222]. Por ejemplo, norepinefrina estimula la secreción de CRH de forma específica, dependiendo de la situación de estrés aplicada [216], hecho que además confirma la especificidad de la respuesta frente a un determinado tipo de estrés en contraposición con la teoría de inespecificidad de la respuesta, elaborada por Selye. La síntesis y secreción de ACTH también se ve influenciada positivamente por norepinefrina frente a determinadas situaciones de estrés [223].

Efectos del estrés agudo

En el estrés agudo tanto el eje HHA como el sistema SAM, son activados [3;4;219;220]. Frente a un estímulo, el hipotálamo secreta CRH y AVP, que actúan sobre la pituitaria anterior produciendo la secreción de ACTH [2;3;6]. El incremento de ACTH en plasma, lleva a un aumento en la secreción de glucocorticoides y aldosterona, por la glándula adrenal [3;33;224]. La activación simpática, por otro lado, induce la secreción de epinefrina por la médula adrenal. Los niveles plasmáticos de ACTH, catecolaminas y glucocorticoides se suelen utilizar para caracterizar la respuesta del organismo frente al estrés, en particular en la fase aguda [2;3].

Se ha encontrado que para determinados tipos de estrés, por ejemplo en el caso del estrés por inmovilización, existe un pico en los niveles de corticosterona que se observa a los 30 segundos, luego de haber ocurrido el estímulo y que precede a la elevación de los niveles de ACTH. Debido a que el sistema nervioso simpático es el mecanismo más rápido que controla la respuesta del organismo frente a una situación de estrés, se piensa que podría ser la causa de este pico prematuro de corticosterona. En realidad, se ha demostrado que las catecolaminas pueden inducir la secreción de glucocorticoides debido a la presencia de axones catecolaminérgicos en la corteza adrenal [3;20;21;225-229].

Procesos inflamatorios agudos llevan a la estimulación del eje HHA mediada por IL-1, IL-6 y TNF. A pesar que IL-1 es la más potente de estas citoquinas, todas ellas llevan a un aumento en los niveles circulantes de ACTH y glucocorticoides [4;6;221].

Se ha demostrado la existencia de un sistema local CRH/ACTH presente en la médula adrenal que ejerce su acción a nivel de la corteza [3;4] y que podría estar involucrado en la secreción inicial de corticosterona. CRH puede estimular directamente la liberación de esteroides y potenciar los efectos de ACTH sobre adrenales de rata aisladas [3;4;230].

Debido a la penetración de las células cromafines de la médula adrenal en la corteza, observada en varias especies, como humanos, bovinos y porcinos, existirían efectos parácrinos estimulatorios (por las catecolaminas y los neuropéptidos) [3;4;231] así como también inhibitorios (por el péptido natriurético atrial y las encefalinas) [3;4;232] sobre la corteza adrenal.

La actividad del sistema simpático también estimula la secreción de renina por el aparato yuxtaglomerular renal, llevando a un incremento en los niveles de AII circulante [233], la cual, junto con ACTH, produce un aumento en la secreción de aldosterona. Existe una relación entre el estrés y el sistema renina-angiotensina; AII puede actuar a nivel del hipotálamo, estimulando la secreción de CRH y en consecuencia activando al eje HHA [3].

Efectos del estrés crónico

La estimulación continua en la secreción de corticosterona debido al estrés crónico, lleva a una "facilitación" de la respuesta del eje HHA frente a un nuevo agente estresor [24;219;234]. El estrés crónico posee influencias estimulatorias a nivel del hipotálamo mientras que, a nivel de la hipófisis, posee influencias negativas sobre el procesamiento del péptido POMC y sobre la secreción de ACTH [235;236].

Esta disociación, también se evidencia a nivel sistémico. Por ejemplo, los niveles de aldosterona plasmática no están aumentados a pesar de existir una elevada actividad de renina plasmática y, en consecuencia, un aumento en los niveles de AII circulante [3;233;237]. Inversamente, los glucocorticoides se encuentran aumentados

mientras que los niveles plasmáticos de ACTH son normales o incluso más bajos [3;238].

Aguilera y colaboradores, sugieren que probablemente el factor inhibitorio que puede oponerse a la estimulación de aldosterona mediada por AII, sea ACTH [239]. Esta hormona estimula la secreción de aldosterona en forma aguda, pero después de una administración prolongada produce un decrecimiento de los receptores a AII en la zona glomerulosa y de la actividad de aldosterona sintetasa [2-4;6;33]. Otros antagonistas de la secreción de aldosterona como las citoquinas, ANP y dopamina, se encuentran activos durante el estrés crónico y, explicaría los bajos niveles de aldosterona en estas situaciones [3].

Debido a los efectos del estrés crónico sobre la zona fasciculata, existe una elevación desproporcionada de los glucocorticoides circulantes, en relación con la ACTH plasmática. Se produce un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas de la zona fasciculata junto con un incremento en el tamaño y peso de la adrenal. Otras causas adicionales que explicarían este fenómeno de disociación son, el incremento en la actividad de los receptores a ACTH debido a un aumento en su número o a una exacerbación de la respuesta post-receptor y una disminución en el *clearance* de corticosterona debido a una disminución de la actividad 11ßHSD hepática [3;220].

1.5.3. EN RESUMEN

La respuesta al estrés involucra una red compleja de mecanismos fisiológicos que permiten el éxito adaptativo frente a situaciones cambiantes o a presiones del medio ambiente de diferente naturaleza. Los dos componentes principales de este sistema son el eje HHA y el SAM. Existe además, una importante relación de estos sistemas con el sistema inmune.

La glándula adrenal juega un rol principal debido a su participación "central", en estos dos sistemas, así como también a la importante interacción de sus productos secretorios con el sistema inmune.

Los agentes estresores, estimulan la liberación de CRH del núcleo paraventricular hipotalámico, induciendo la secreción de ACTH de la hipófisis y en consecuencia, de corticoides de la corteza adrenal. También, existe liberación de corticoides antes de que ocurra la estimulación por ACTH debido, muy probablemente, a la estimulación directa del sistema simpático.

En condiciones de estrés crónico, la corteza adrenal sufre una adaptación que permite la hipersecreción de glucocorticoides sin el correspondiente aumento de ACTH.

Existen, además, otros aspectos que son importantes en la respuesta del organismo frente a una situación de estrés. Entre ellos se encuentran los efectos parácrinos de la secreción cortical sobre las células medulares y, recíprocamente, la influencia de la médula sobre la corteza, tanto a través de un contacto directo como por la inervación local.

También hay que considerar los efectos vasculares ya que estos median la acción de ACTH. La existencia de algunos ejes hormonales locales como el de CRH/ACTH y el de renina-angiotensina, parecen ser de importancia en la modulación de la respuesta de la glándula adrenal al estrés. Por último, no hay que olvidar la presencia, a nivel local, de células como los mastocitos, macrófagos y células endoteliales, que secretan sustancias que participan en la regulación de la corteza adrenal.

1.6. LA SEROTONINA

La serotonina (3-(ß-aminoetil)-5-hidroxindol) o 5-hidroxitriptamina (5HT), ha sido reconocida por más de 50 años como molécula con efecto pleiotrópico (Figura 1.6.1.). Entre ellos se encuentran: su acción sobre el músculo liso, su intervención en la estimulación de la agregación plaquetaria y de la motilidad gastrointestinal, sus efectos vasoconstrictores y su función como molécula neurotransmisora.

La 5HT se encuentra en altas concentraciones en las células enterocromafines a lo largo del tracto gastrointestinal [240]. También se la puede hallar en plaquetas [240-242], riñón [243-245], glándula adrenal [2;4;21] y en regiones específicas del sistema nervioso central [212;240;246;247].

A pesar de ser una molécula involucrada en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos, todavía no existe un modelo de acción definido, debido a la alta complejidad del sistema serotoninérgico. Esta complejidad está dada, en primer lugar, por los múltiples subtipos de receptores que existen para 5HT, los cuales fueron inicialmente caracterizados por estudios farmacológicos y posteriormente sus identidades confirmadas por clonado [240;247] y, en segundo lugar, debido a la importante modulación que sufre el sistema serotoninérgico, a distintos niveles, por parte de las hormonas sexuales, los adrenocorticoides y las hormonas tiroideas [240;247].

1.6.1. SÍNTESIS Y METABOLISMO

5HT se encuentra ampliamente distribuída tanto en el reino animal como en el vegetal. Su síntesis ocurre en dos pasos a partir del aminoácido, triptofano (Figura 1.6.1.). La triptofano-hidroxilasa (TH), enzima limitante en esta vía de síntesis, no sufre inhibición por producto final ni es saturable por sustrato, razón por la cual, la cantidad

de triptofano que ingresa al tejido influencia directamente la síntesis de 5HT [240;247;248].

El triptofano pasa a L-5-hidroxitriptofano por acción de la TH, éste es luego decarboxilado por la enzima L-dopa decarboxilasa para formar 5-hidroxitriptamina. La serotonina sintetizada es almacenada en vesículas y liberada por exocitosis frente a distintos estímulos.

En la principal ruta de metabolización de 5HT está involucrada la enzima monoamina oxidasa (MAO) que se localiza en la membrana mitocondrial externa y cataliza la deaminación oxidativa de varios neurotrasmisores (dopamina, norepinefrina, 5HT).

Existen dos isoformas de la monoamina oxidasa, MAO-A y MAO-B. La MAO-A metaboliza preferencialmente 5HT y norepinefrina. La MAO-B prefiere ß-feniletilamina y bencilamina como sustratos. Ambas isoformas pueden metabolizar dopamina y triptamina [240;249].

En el caso de la metabolización de 5HT, la MAO, forma ácido 5-hidroxindol acético (5-HIAA, **5**-**h**ydroxy**i**ndole **a**cetic **a**cid) y en menor medida 5-hidroxitriptofol (5-HTOL, **5**-**h**ydroxy**t**rypt**o**pho**l**). Debido a que el 5-HIAA, corresponde a casi el 100% de la metabolización de 5HT, la tasa de recambio de 5HT se estima por cuantificación de los niveles de 5-HIAA y por la relación 5-HIAA/5HT [21;240;247;249].

El riñón contiene la mayor actividad de monoamina oxidasa de todo el organismo [245;249]. Se han detectado ambas isoformas tanto en corteza como en médula renal. Las células mesangiales del glomérulo sólo expresan a la isoforma A de la monoamino oxidasa, la cual se cree que es la responsable de la regulación de los niveles de 5HT extracelular. La metabolización de las catecolaminas y de 5HT por la MAO-A renal, lleva a la producción de peróxido de hidrógeno, el cual se ha demostrado que regula la proliferación de las células epiteliales renales [249].

En las neuronas, también se expresan ambas isoformas de la MAO, mientras que la MAO-B es la principal isoforma presente en plaquetas [21;240].

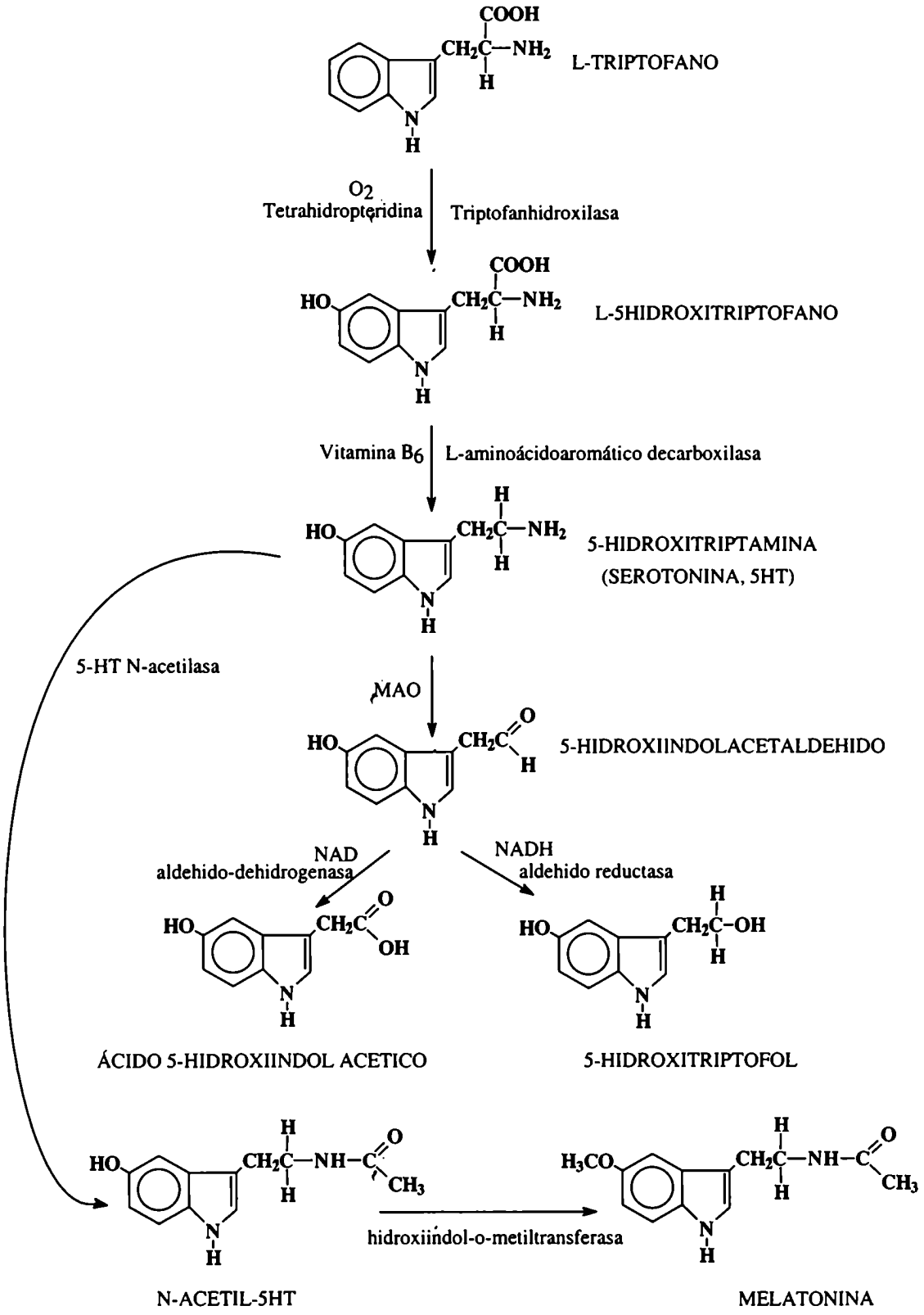


Figura 1.6.1. *Síntesis e inactivación de serotonina..*

1.6.2. MÚLTIPLES RECEPTORES PARA 5HT

Las múltiples acciones que tiene 5HT se explican por la interacción con distintos subtipos de receptores., los cuales pertenecen a una gran familia de receptores de neurotransmisores. La expresión de cada subtipo de receptor es diferencial pero superpuesta. Los distintos subtipos de receptores se encuentran acoplados a diferentes mecanismos de señalización a través de la membrana [240;247;250].

Estos subtipos pueden dividirse en varias familias de acuerdo a las similitudes en su secuencia. La familia de receptores $5HT_1$ es la más grande e incluye a los receptores $5HT_{1A}$, $5HT_{1B}$, $5HT_{1D}$, $5HT_{1E}$, $5HT_{1F}$, $5HT_{5A}$, $5HT_{5B}$ y $5HT_7$. Los receptores dentro de la familia $5HT_1$ están acoplados a proteína G y su estimulación lleva a la inhibición de la adenilato ciclasa, con la excepción del receptor $5HT_7$, que produce un incremento en la actividad de la misma [240;247;250-252].

La familia $5HT_2$, está compuesta por los receptores $5HT_{2A}$, $5HT_{2B}$ y $5HT_{2C}$, que estimulan la hidrólisis de fosfoinositol, a través de la activación de la fosfolipasa C, y por el receptor $5HT_6$ que estimula la actividad de la adenilato ciclasa.[240;247]. El receptor $5HT_{2C}$ no sólo se encuentra acoplado a la fosfolipasa C sino también a la fosfolipasa A y a la cascada de señalización del ácido araquidónico [253].

Los miembros de la familia $5HT_3$, pertenecen a la familia de canales iónicos activables por ligando. La estimulación de estos receptores lleva a una rápida despolarización de la membrana plasmática con transporte de cationes monovalentes como el sodio y el potasio [240;247;254]. Los receptores pertenecientes a la familia $5HT_4$, activan a la adenilato ciclasa, llevando a un aumento en los niveles de AMPc [240].

1.6.3. SITIOS DE ACCIÓN DE 5HT

Células enterocromafines

Las células enterocromafines se localizan en la mucosa gastrointestinal, con una densidad muy alta en el duodeno. Estas células sintetizan y almacenan 5HT, y son la principal fuente de serotonina presente en la circulación sistémica [240;247].

La liberación basal de 5HT se ve aumentada por tensiones mecánicas en la pared intestinal debido por ejemplo, a la comida, a la administración de una solución salina hipertónica o a la estimulación vagal [240].

Plaquetas

La 5HT no es sintetizada por las plaquetas, pero es captada desde la circulación y almacenada en gránulos secretorios, por transporte activo. Cuando las plaquetas toman contacto con alguna lesión en el endotelio, liberan sustancias que estimulan la agregación plaquetaria, entre ellas se encuentran 5HT, ADP (adenosin diphosphate), trombina y tromboxano A2 [240;241].

La 5HT liberada por las plaquetas actúa de manera autócrina sobre éstas, a través de los receptores $5HT_{2A}$ presentes en la membrana plasmática y, en presencia de colágeno, promueve la agregación plaquetaria [240;241].

Si el daño de los vasos sanguíneos es tan profundo que llega al músculo liso que reviste al endotelio, entonces 5HT ejerce un efecto vasoconstrictor directo sobre el músculo [240;241].

Sistema cardiovascular

La respuesta clásica de los vasos sanguíneos a 5HT es la contracción, particularmente de los vasos renales [255], pulmonares y cerebrales [240]. La 5HT también estimula la liberación del factor relajante derivado de endotelio ($EDRF_1$

endothelium-derived relaxing factor) y de prostaglandinas, por parte del endotelio vascular. Estos factores tienden a contrarrestar la acción vasoconstrictora de 5HT [240].

Por otro lado, 5HT amplifica la acción constrictora local de norepinefrina, AII y de histamina [240].

Riñón

La serotonina es sintetizada por las células que forman parte del túbulo proximal y actúa de manera parácrina/autócrina estimulando la liberación de renina [242] y la reabsorción de fosfatos por un mecanismo dependiente de sodio. Además, atenúa el efecto inhibitorio de la reabsorción de fosfatos, mediado por la hormona paratiroidea [243;244].

Produce contracción de la arteria renal y, directa o indirectamente, estimula la síntesis, por parte del endotelio renal, de oxido nítrico que actúa oponiéndose a su efecto vasoconstrictor [255].

Glándula adrenal

Dependiendo de la especie, se ha detectado presencia de 5HT, únicamente, en la médula adrenal o, tanto en la médula como en la corteza. En humanos, 5HT, está presente en los mastocitos perivasculares, por lo que se cree que sería liberada durante procesos inflamatorios o alérgicos [4;21;256;257].

Se ha demostrado que 5HT estimula la producción de glucocorticoides y mineralocorticoides a partir de las células adrenocorticales, sugiriendo un control parácrino/autócrino de la serotonina sobre la actividad secretoria de la corteza adrenal [4;21;242;256;257].

El mecanismo propuesto para 5HT en la adrenal de humanos, involucra la interacción de tres tipos celulares: 1) los mastocitos, que liberan la serotonina almacenada ante un estímulo específico; 2) las células esteroidogénicas, sobre las que actúa la serotonina a través de sus receptores de membrana, aumentando la secreción de

corticoides; y 3) las células cromafines que expresan a la MAO-A, por lo cual estarían involucradas en la finalización del efecto de 5HT [21].

Sistema nervioso central

La mayoría de los cuerpos celulares conteniendo 5HT están localizados en los núcleos del rafe que formn parte del cerebro medio; específicamente en el núcleo del rafe dorsal y en el núcleo del rafe medio. Estos dos núcleos envían las proyecciones serotoninérgicas a través del cerebro, mostrando un patrón de inervación distintivo: el rafe medio envia proyecciones a regiones límbicas como hipocampo, septum, hipotálamo y amígdala; mientras que el rafe dorsal envia proyecciones a los ganglios basales, corteza cerebral, tálamo y cerebelo [240;247;248].

Todos los receptores de 5HT clonados hasta el momento se expresan en el cerebro [21;240;248;258].

Existe una multitud de funciones cerebrales influenciadas por 5HT, incluyendo el sueño, funciones cognitivas, percepciones sensoriales, actividad motora, regulación de la temperatura, la presión arterial, el apetito, el dolor, la conducta sexual y la secreción hormonal [21;240;248;258;259].

Se ha observado, también, la existencia de un control central de serotonina sobre las funciones cardiovasculares, en donde, dependiendo del tipo de receptor que se active, se obtienen efectos depresores o presores de la función cardíaca [258] .

Ante determinadas situaciones de estrés, existen alteraciones en la neurotrasmisión serotoninérgica, las cuales son dependientes de la activación del eje HHA [260]. Así, por ejemplo, se ha encontrado que un incremento en la secreción de CRH debido a una situación de estrés, produce un aumento en los niveles de la 5HT liberada en el hipocampo. Este aumento de 5HT, lleva a un incremento en la expresión del GR en esa región del cerebro [246;250;261]. Es decir, que el sistema serotoninérgico rafe-hipocampo, responde, específicamente, ante una situación de estrés -mediada por el aumento de CRH-, con un incremento en la sensibilidad del tejido a los glucocorticoides.

Por otro lado, se ha encontrado que serotonina estimula la secreción de ACTH por activación, principalmente, de los receptores $5HT_{1A}$, $5HT_{2A}$ y $5HT_{2C}$ [262].

1.6.4. REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES SEROTONINÉRGICAS POR LAS HORMONAS ADRENALES Y VICEVERSA

Las hormonas adrenales intervienen en la modulación del sistema serotoninérgico a distintos niveles:

- Trabajos realizados por McEwen y colaboradores han demostrado que los glucocorticoides, tanto naturales como sintéticos, producen un aumento de los niveles de serotonina por activación de la enzima TH [247].
- Se encuentran involucradas en el desarrollo del sistema nervioso central serotoninérgico [247].
- Regulan, de manera diferencial, las funciones de los distintos subtipos de receptores. Así, por ejemplo, la actividad y la expresión del mRNA del receptor $5HT_{1A}$, aumentan luego de la adrenalectomía y disminuye en presencia de esteroides adrenales [247].
- Un aumento en los niveles de glucocorticoides circulantes, lleva a un incremento en la captación de 5HT por las células periféricas y las neuronas corticales, debido a la estimulación de la expresión, en membrana plasmática, de la proteína transportadora de serotonina [263].
- Además de afectar los niveles de serotonina circulante, el estrés produce alteraciones en la concentración y metabolización de 5HT en el SNC. Frente a una situación de estrés agudo, existe una elevación de los niveles de 5-HIAA, de la relación 5-HIAA/5HT y de la actividad serotoninérgica total [212;246;247;250;261].

Por otro lado, los niveles de serotonina también afectan las funciones adrenocorticales. Se ha encontrado que a nivel del SNC, una deficiencia en serotonina produce una disminución en los niveles de expresión del GR y del MR presentes en hipocampo, y como consecuencia se produce una atenuación de la retroalimentación

negativa sobre el eje HHA [8;250].

En una línea celular derivada de hipocampo fetal se ha observado que la serotonina estimula la expresión del mensajero del GR pero no del MR [264].

En la glándula adrenal serotonina estimula la producción tanto de aldosterona como de los glucocorticoides [4;21;242].

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis es el estudio de la regulación de la enzima 11ßHSD2 renal frente a diversas situaciones de estrés, y su relación con factores involucrados en la generación de hipertensión. A continuación se detallan los objetivos particulares:

i) En primer lugar se deberán establecer las condiciones óptimas de trabajo para la realización de los estudios cinéticos frente a las distintas situaciones de estrés ensayadas.

ii) Se estudiará si existe algún tipo de variación de la actividad enzimática, a punto único, en animales intactos, sometidos a estrés agudo por generación de una acidosis metabólica o por la introducción de una sonda bucogástrica.

iii) Se realizarán estudios cinéticos de la actividad 11ßHSD2 en animales adrenalectomizados y se evaluará el rol que juega la glándula adrenal en la regulación de la actividad enzimática frente a las mismas situaciones de estrés agudo.

iv) Debido a que los glucocorticoides intervienen en el estrés y a que, en condiciones patológicas como ocurre con los sindromes de aparente exceso de mineralocorticoides o el de Cushing, llevan a la generación de hipertensión arterial; se analizará la actividad enzimática en animales adrenalectomizados sometidos a un tratamiento agudo o crónico con diferentes dosis de corticosterona.

v) En caso de existir variaciones de la actividad enzimática, se analizará si las mismas correlacionan con modificaciones en la abundancia de la 11ßHSD2. Para ello se deberán buscar las condiciones óptimas para la realización de los ensayos de Western-blot.

vi) Se estudiará, no sólo la regulación de la 11ßHSD2 por factores adrenales, sino también por factores extra-adrenales, involucrados en la respuesta al estrés. La existencia de otros ejes intervinientes en la homeostasis del estrés, junto con las, relativamente recientes, evidencias de la presencia de los mismos a nivel local,

modulando dicha respuesta de manera autócrina/parácrina, llevó a plantear la posibilidad de un sistema de regulación de la 11ßHSD2 por bioaminas sintetizadas intra-renalmente. En esta Tesis se estudiará el efecto de serotonina sobre la actividad 11ßHSD2 en una línea celular derivada de riñón distal de perro. Para ello se deberán buscar las condiciones óptimas para la, posterior caracterización del nuevo sistema de incubación. Se realizarán los estudios cinéticos correspondientes.

vii) Se evaluará el efecto de serotonina sobre la actividad de la enzima 11ßHSD2.

viii) Se estudiará la especificidad del efecto de serotonina, mediante la utilización de antagonistas específicos de sus receptores.

Diseño Experimental

3.1. MATERIALES

3.1.1. REACTIVOS

La corticosterona tritiada ([$^3H_{1,2,6,7}$] corticosterona; actividad específica = 70 μCi/mmol) y el reactivo quimioluminiscente NEL100, fueron comprados a New England Nuclear, Life Sciences Products, Boston, MA, USA. El líquido de centelleo HiSafe 3 de Wallac, fue comprado a ETC Internacional.

Las placas de sílica gel 60 F 254, el papel Whatman 3MM, la acrilamida, la bisacrilamida, el acetato de etilo, el cloruro de metileno y el metanol fueron comprados a Merck-Darmstadt, República Federal de Alemania.

Las placas autorradiográficas fueron obtenidas de Dupont, Wilmington, DE, USA.

Los anticuerpos primarios específicos para la 11ßHSD2 y para corticosterona, fueron generosamente donados por los Dres. Celso Gómez Sánchez (Columbia, MO) y Eduardo Cozza (Buenos Aires), respectivamente.

El anticuerpo secundario anti IgG de oveja conjugado a peroxidasa fue comprado a Rockland, Gilbertsville, PA, USA.

La línea celular MDCK fue comprada a la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC).

La serotonina y la ketanserina (antagonista receptores $5HT_2$), fueron donados por el Dr. Rodolfo Pedro Rothlin.

La metiotepina (antagonista de los receptores $5HT_1$), fue generosamente donada por la Dra. Lidia Szczupak (FCEyN, UBA).

El suero fetal bovino BIOSER, fue comprado a Nutrientes Celulares y los demás reactivos para cultivos celulares fueron comprados a GIBCO o a HyClone.

El resto de los reactivos fueron comprados a Sigma-Aldrich.

3.1.2. EQUIPAMIENTO

Los equipos utilizados para llevar a cabo esta Tesis Doctoral fueron:

Centrífuga refrigerada marca SORVALL (Dupont) Modelo RC5C.

Ultracentrífuga marca BECKMAN.

Centrífuga de mesa para Eppendorf marca Hermle Z200M/H.

Centrífuga refrigerada marca Jouan, Modelo CR412.

HPLC Spectraphysics, compuesto por bomba de inyección Spectra Series P100, detector Spectra Series UV100 e integrador Data Jet SP 4600 de Spectraphysics.

Baño termostático marca Vicking, Modelo Dubnoff.

Espectrofotómetro Bacharach Coleman®, Modelo 35.

PHmetro marca CONSORT, P800.

Fuente de poder Bio-Rad, PAC 200.

Contador de Centelleo líquido marca WALLAC, 1409 DSA.

Estufa para cultivos celulares marca Forma Scientific.

Flujo laminar marca Telstar PV-30/70.

3.2. METODOS

3.2.1. TRATAMIENTO DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE ANIMALES

En los experimentos realizados con animales, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 300-350 g de peso, las cuales fueron compradas al bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires o al bioterio dirigido por el Dr. Barassi.

Esta cepa de rata fue elegida para la realización de los experimentos debido a que no desarrolla adrenales accesorias luego de la adrenalectomía.

Los animales fueron mantenidos con alimento balanceado y agua, *ad libitum*; en jaulas higienizadas diariamente. Para el caso de las ratas adrenalectomizadas (ADX), también se les suministró solución fisiológica (NaCl 0,9% p/v).

La adrenalectomía de los animales fue realizada por incisión dorsal, por lo menos 48 hs antes de la realización de los distintos tratamientos. Este es el tiempo mínimo que se requiere para lograr la desaparición casi completa de los corticoides circulantes [265].

Siempre se trabajó con grupos de 3 a 4 ratas, salvo para el caso del tratamiento con HCl en el que el número de animales fue mayor, entre 4-6 ratas. Todos los tratamientos fueron realizados entre las 9:00 hs – 11:00 hs AM, período durante el cual los niveles de corticosterona circulante se encuentran bajos.

a) Generación de estrés agudo en animales intactos.

Para el tratamiento de los animales intactos se siguió el protocolo desarrollado anteriormente en nuestro laboratorio por Igarreta y col. [266]. Los grupos de animales fueron los siguientes:

Intactos: animales no sometidos a ningún tipo de estrés.

Intactos + sonda: animales expuestos por dos minutos, a una atmósfera saturada con éter etílico para poder introducirles un catéter de goma por esófago durante un minuto.

Intactos + acidosis: animales expuestos por dos minutos, a una atmósfera saturada con éter etílico para poder realizar la sobrecarga con 10 ml de HCl 200 mM por medio de un catéter de goma introducido por esófago. De esta forma se logra generar en el animal una acidosis metabólica.

A todos los grupos se les retiró el alimento balanceado 12 hs antes de la realización de los distintos tratamientos.

Luego de 2 horas postratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los riñones.

b) Generación de estrés agudo en animales adrenalectomizados.

Los grupos de animales utilizados fueron los siguientes:

Sham: animales a los que se les realizó una adrenalectomía simulada. Es decir, se los anestesió, se les realizó una incisión dorsal, se tocaron las adrenales con material quirúrgico y luego se cerró la incisión dorsal. Este tratamiento, además de servir como control de la adrenalectomía, produce *per se* una situación de estrés en el animal llamada *estrés quirúrgico* [267].

ADX: animales adrenalectomizados.

ADX + sonda: animales adrenalectomizados, que posteriormente fueron expuestos, durante dos minutos, a una atmósfera saturada con éter etílico para poder introducirles un catéter de goma por esófago durante un minuto.

ADX + acidosis: animales adrenalectomizados, que posteriormente fueron expuestos, durante dos minutos, a una atmósfera saturada con éter etílico para poder sobrecargarlos con 10 ml de HCl 200 mM por medio de un catéter de goma introducido por esófago.

ADX + acidosis + B: animales adrenalectomizados, sobrecargados con 10 ml de HCl 200 mM y a los que, también, se les administró intramuscularmente corticosterona en una dosis de 68 μg /100 g peso corporal.

A todos los grupos se les retiró el alimento balanceado 12 hs antes de la realización de los distintos tratamientos.

Luego de 2 horas postratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los riñones.

c) Administración aguda de corticosterona a animales adrenalectomizados.

Las distintas dosis de corticosterona fueron disueltas en el momento de la administración, con la solución vehículo, formada por etanol absoluto:propilenglicol:solución fisiológica en relación 1:1:18

A los animales adrenalectomizados se les inyectó, intramuscularmente, la solución vehículo o las distintas dosis de la corticosterona disuelta en la solución vehículo. Las dosis fueron elegidas a partir de los trabajos realizados por Akana [219] y por nuestro propio grupo de investigación [79;84;85;87].

Los grupos fueron los siguientes:

ADX + vehículo: animales inyectados sólo con el solvente en el cual se disolvió la hormona.

ADX + 1 μg: animales inyectados con 1 μg de corticosterona cada 100 g de peso corporal.

ADX + 4 μg: animales inyectados con 4 μg de corticosterona cada 100 g de peso corporal.

ADX + 68 μg: animales inyectados con 68 μg de corticosterona cada 100 g de peso corporal.

ADX + 308 μg: animales inyectados con 308 μg de corticosterona cada 100 g de peso corporal.

Luego de 2 horas postratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los riñones.

d) Administración crónica de corticosterona a animales adrenalectomizados.

Para la administración crónica, la hormona fue disuelta en el momento de la inyección. Los dos primeros días la corticosterona fue disuelta en aceite para lograr una liberación más lenta de la hormona hacia el torrente sanguíneo. La última dosis, correspondiente al día 3 fue disuelta en etanol absoluto:propilenglicol:solución fisiológica en relación 1:1:18.

Los animales adrenalectomizados fueron inyectados intramuscularmente, durante tres días con la solución vehículo correspondiente, o con las distintas dosis de corticosterona disuelta en la solución vehículo adecuado. Los tratamientos de los grupos de animales fueron similares a los indicados en el punto anterior (*Administración aguda de corticosterona a animales adrenalectomizados*)

Al tercer día y, luego de 2 horas de la última inyección, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los riñones.

3.2.2. MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS EN ANIMALES ACIDÓTICOS

A fin de corroborar que la sobrecarga con HCl genera una disminución del pH sanguíneo, se midieron los parámetros sanguíneos del grupo ADX + acidosis, tomando como valores control los parámetros sanguíneos obtenidos para los grupos ADX y Sham. Para ello, 2 horas después del tratámiento y antes de la extracción de los riñones, se retiró sangre por aorta con jeringa heparinizada e inmediatamente se midió el pH sanguíneo y la PCO_2 con un analizador MiniQ ácido-base. La concentración de

bicarbonato en sangre fue calculada de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

3.2.3. PREPARACIÓN DE LA FUENTE ENZIMÁTICA.

Al cabo de las 2 hs. postratamiento los riñones fueron lavados con NaCl 0,9% p/v, inyectada a través de la aorta, extraídos y descapsulados. Manteniendo una temperatura de 4 °C, se procedió a su homogeneización utilizando para ello un homogeneizador de Potter-émbolo, del tipo teflón-vidrio, en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4 conteniendo $MgCl_2$ 1,5 mM. Se utilizaron 25 ml de buffer por gramo de tejido.

Los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación de 105.000 xg durante 60 minutos.

El precipitado final, correspondiente a la fracción microsomal, fue resuspendido en buffer fosfato (0,1 M pH 7,4 conteniendo $MgCl_2$ 1,5 mM) y la concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford [268].

La fracción microsomal proveniente de cada tratamiento fue fraccionada y guardada a –20 °C para la posterior realización de estudios cinéticos, de actividad enzimática y para las mediciones de abundancia enzimática (el mantenimiento de la fracción microsomal a –20 °C, nunca superó los 6 meses).

3.2.4. ESTUDIOS CINÉTICOS CON MICROSOMAS RENALES. METODOLOGÍA ESTÁNDAR DE TRABAJO

El sistema de incubación para los estudios cinéticos estuvo compuesto por:

Una suspensión de microsomas conteniendo 250 μg de proteína/ml.

400 μM de NAD^+, como cofactor.

3 nM, 7 nM y 14 nM de corticosterona tritiada (^{3}H-B).

cantidades crecientes de corticosterona radioinerte (0-200 nM) disuelta en buffer fosfato.

El volumen final de incubación fue de 250 μl en buffer fosfato de sodio 0,1M pH 7,4 conteniendo $MgCl_2$ 1,5 mM.

La reacción se inició por el agregado del cofactor y las incubaciones se realizaron en baño termostático, a 37 °C durante 10 minutos con agitación constante. La reacción se detuvo por el agregado de 2,5 ml de acetato de etilo. Una vez extraídos los esteroides, se separó la fase orgánica y se llevó a sequedad bajo atmósfera de N_2, a temperatura ambiente. Posteriormente, los esteroides se resuspendieron en 70 μl de una solución de cloruro de metileno:metanol (95:5) y se procedió a sembrarlos (en punto) en placa de TLC (sílica gel 60) con indicador de fluorescencia F 254. La corrida se realizó con una mezcla de cloroformo:etanol 96° (92:8) como fase móvil.

Al cabo de, aproximadamente, 90 minutos se detuvo el desarrollo de la cromatografía y se realizó el revelado de los esteroides por exposición a la luz UV. Se marcaron las zonas correspondientes a corticosterona y 11-dehidrocorticosterona, se extrajo la sílica de esas zonas, la misma fue disuelta en el líquido de centelleo HiSafe 3 (Wallac) y se determinó la radiactividad usando un contador de centelleo líquido (Wallac, 1409 DSA).

3.2.5. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD, A PUNTO ÚNICO, DE LA 11ßHSD2 CON MICROSOMAS RENALES

Para la medición de actividad de la isoforma 2 se utilizó una concentración de corticosterona tritiada de 14 nM, correspondiente a 500.000 dpm/250 μl de incubado. El protocolo coincide con el realizado para los estudios cinéticos. La concentración de corticosterona así como también la concentración de cofactor y el buffer de incubación fueron elegidos según los trabajos publicados por diferentes grupos de investigación [29,195,210,266,269].

3.2.6. ESTUDIOS DE ABUNDANCIA DE LA ISOFORMA 11ßHSD2. METODOLOGÍA ESTÁNDAR DE TRABAJO

Setenta microgramos de proteínas, provenientes de las fracciones microsomales renales de los distintos tratamientos realizados en los animales, fueron resuspendidas en buffer de siembra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol 10 %, SDS 2 %, ß-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,05 %) y analizadas en un SDS-PAGE preparado con 10 % de poliacrilamida. La corrida electroforética se realizó a 120 Volts durante 90 minutos, al cabo de los cuales, las proteínas ya separadas, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 50 minutos a 120 Volts, en frío. La eficiencia de la transferencia se corroboró por tinción de la membrana con Rojo Ponceau S 0,2 % (p/v) en ácido acético 1 % (v/v), y la intensidad de las bandas se utilizó para estandarizar la cantidad de proteína sembrada.

Posteriormente, se realizó el bloqueo con buffer fosfato salino (PBS) conteniendo Tween 20 0,05 % (v/v) (PBST) y leche descremada 5 % (p/v), durante 1 hora a temperatura ambiente.

La incubación con el primer anticuerpo policlonal, específico para la 11ßHSD2, fue realizada durante toda la noche a 4 °C (dilución 1/8000 en PBST con BSA 1 % p/v). La incubación con el segundo anticuerpo anti-IgG de oveja conjugado a peroxidasa se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, dilución 1/4000 en PBST con BSA 1 % (p/v).

Luego de 15 lavados de 5 minutos cada uno, realizados con PBST, la membrana fue incubada durante 1 minuto con un sustrato quimioluminiscente. Las placas autorradiográficas fueron reveladas y aquellas bandas correspondientes a un peso molecular de 40.000, fueron escaneadas y sus intensidades cuantificadas, utilizando el programa MD Image Quant (versión 3.3).

3.2.7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CORTICOSTERONA POR RADIOINMUNOENSAYO.

Dos horas después del tratamiento de los animales y antes de la remoción de los riñones, se extrajo sangre de la aorta con jeringa heparinizada y se midieron los niveles plasmáticos de corticosterona por radioinmunoensayo.

La reacción fue llevada a cabo en tubos de Kahn de polipropileno. Cada tubo de la reacción contuvo:

Buffer borato de sodio 0,1 M pH 8 con 1 % (p/v) de la fracción V de BSA y 0,2 % (p/v) de inmunoglobulina G.

Anticuerpo policlonal anticorticosterona, obtenido a partir de oveja, en dilución 1/4000.

Corticosterona tritiada, 5.000 dpm.

Corticosterona radioinerte, ya sea el estándar o proveniente de la muestra bajo estudio.

El volumen final de incubación fue de 200 μl.

Para la determinación cuantitativa de corticosterona fue necesario confeccionar una curva de calibración, la cual abarcó un rango desde 0 pg hasta 1000 pg de corticosterona radioinerte. Las soluciones estándares fueron preparadas con buffer borato de sodio 0,1 M pH 8, conteniendo 5 % (v/v) de metanol.

El protocolo general consistió en agregar 10 μl de cada una de las soluciones estándar – para la curva de calibración – ó 10 μl de la muestra incógnita proveniente del plasma de los animales tratados. Luego se incorporó la corticosterona tritiada en una cantidad que permita obtener una actividad total de 5.000 dpm y el anticuerpo específico para corticosterona, todo disuelto en 200 μl del buffer. Para poder cuantificar la radiactividad inespecífica, se incubó la corticosterona tritiada en ausencia de anticuerpo y en ausencia de corticosterona radioinerte.

El proceso de unión del anticuerpo a la hormona se dejó transcurrir durante 16 horas a 4 °C, al cabo de las cuales la reacción se detuvo por el agregado de una solución fría de sulfato de amonio saturado al 75%. Los tubos se centrifugaron a máxima

velocidad, durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. Las cuentas totales se calcularon a partir de tubos preparados de la misma manera que para el conteo inespecífico, pero sin realizar la centrifugación de los mismos. Los sobrenadantes conteniendo a la corticosterona tritiada no unida al anticuerpo, se volcaron a viales y se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Los valores obtenidos son transformados a valores de masa de corticosterona unida mediante un programa de computación que ajusta los valores obtenidos de la curva de calibración a una función matemática no lineal de cuatro parámetros (NIH Bethesda, MD: RIA PC, 1989).

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

$$\text{Unido} = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{\text{Masa}}{C}\right)^{B}} + D$$

Siendo A la máxima cantidad unida, B la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C la concentración efectiva 50 y D la unión inespecífica.

Una vez obtenidos los parámetros, se determina la masa incógnita despejando la misma de la ecuación.

Previo a la realización del radioinmunoensayo tanto los estándares como las muestras de plasma se tratan con metanol y se dejan toda la noche para lograr su evaporación. Este tratamiento provoca la desnaturalización de las proteínas plasmáticas con la consecuente liberación del esteroide unido.

3.2.8. MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR

Para el crecimiento y mantenimiento de las células MDCK, se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Minimunn Essential Medium) con alta glucosa (25 mM) con antibiótico-antimicótico 1%, suplementado con suero fetal bovino 10%. Las células

fueron crecidas en frascos T75, en estufa con una atmósfera controlada de CO_2 al 5 % y a 37 °C.

Para la realización de los experimentos siempre se utilizaron células crecidas hasta un 80% de confluencia. El día de realización del experimento, se reemplazó el medio de las células por medio nuevo fresco libre de suero. Luego de tres horas, las células fueron levantadas de los frascos T75 por incubación, durante 15 minutos, con tripsina 0,25 %. Los experimentos se realizaron con las células en suspensión.

3.2.9. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN CÉLULAS MDCK. METODOLOGÍA ESTÁNDAR DE TRABAJO

a) Estudios cinéticos.

Las incubaciones se realizaron en placas de plástico de 24 pocillos, en baño termostático a 37 °C, con agitación constante lenta y en oscuridad.

El sistema de incubación estuvo compuesto por:

50 μl de glicerol 87 %.

4 x 10^6 células.

Corticosterona tritiada en un rango de concentraciones que fueron desde 1 nM hasta 40 nM final, las cuales fueron realizadas en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4.

Medio DMEM de alta glucosa para llevar a un volumen final de 500 μl.

La reacción se inició por el agregado de las células. Luego de 75 minutos de incubación y antes de la finalización de la reacción, se adicionó a cada pocillo 10 μl de una mezcla de estándares de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona disueltos en metanol, en una concentración de 0,25 mg/ml. La adición de los estándares permitió evaluar el porcentaje de pérdida durante la extracción de los esteroides del medio de incubación y, a la vez, sirvieron para lograr la visualización de los picos correspondientes a corticosterona y 11-dehidrocorticosterona mediante el detector UV-visible del HPLC.

El incubado correspondiente a cada pocillo se recogió en tubos Eppendorf y se centrifugó a baja velocidad durante 30 segundos. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo Eppendorf y el pellet celular se lavó con buffer fosfato y se guardó a –20 °C, para realizar la cuantificación de proteínas por el método de Bradford [268].

Los esteroides presentes en el sobrenadante se extrajeron con acetato de etilo (3 extracciones de 500 μl cada una) y fueron llevados a sequedad bajo atmósfera de N_2, a 37 °C. En el momento de realizarse la separación por HPLC, los esteroides fueron redisueltos en 25 μl de metanol.

Para obtener el valor del ruido de fondo de cada experimento (tiempo cero), al sistema de incubación en ausencia de células se lo lleva a 37 °C, se incorporan los 10 μl de los marcadores de pérdida y posteriormente se incorporan las células. Inmediatamente se recoge el incubado, se centrifuga para separar el sobrenadante de las células, y se sigue el mismo procedimiento que para el resto de los puntos.

b) Estudios de actividad a punto único.

Estudios realizados a saturación de sustrato.

Las incubaciones fueron realizadas en placas de plástico de 24 pocillos, en baño termostático a 37 °C, con agitación constante lenta y en oscuridad.

El sistema de incubación estuvo compuesto por:

50 μl de glicerol 87 %.

4 x 10^6 células.

Corticosterona tritiada 5 nM final.

Corticosterona radioinerte 1 μM final, la cual fue disuelta en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4.

Medio DMEM con alta glucosa para llegar a un volumen final de 500 μl.

La reacción se inició por el agregado de las células. Luego de 90 minutos de incubación y antes de la finalización de la reacción se adicionó a cada pocillo 10 μl de una mezcla de estándares de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona disueltos en

metanol en una concentración de 0,25 mg/ml. Posteriormente, se siguieron los mismos pasos que los indicados en el punto a)

Estudios realizados con concentraciones no saturantes de sustrato.

Las incubaciones se realizaron en placas de plástico de 24 pocillos, en baño termostático a 37 °C, con agitación constante lenta y en oscuridad.

El sistema de incubación estuvo compuesto por:

50 μl de glicerol 87 %.

4 x 10^6 células.

Corticosterona tritiada 10 nM final, disuelta en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4.

Medio DMEM con alta glucosa para llegar a un volumen final de 500 μl.

La reacción se inició por el agregado de las células. Luego de 75 minutos de incubación y antes de la finalización de la reacción se adicionó a cada pocillo 10 μl de una mezcla de estándares de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona disueltos en metanol en una concentración de 0,25 mg/ml. Posteriormente, se siguieron los mismos pasos que los indicados en el punto a)

c) Estudios de inhibición de la actividad enzimática.

El sistema de incubación fue similar al descripto en el punto b), salvo por el agregado de diferentes concentraciones de carbenoxolona (1 μM; 0,1 μM y 0,01 μM finales). La carbenoxolona fue disuelta en agua destilada y las posteriores diluciones fueron realizadas con buffer fosfato 0,1 M pH 7,4.

3.2.10. EFECTO DE SEROTONINA SOBRE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN CÉLULAS MDCK.

a) Efecto de serotonina en presencia de corticosterona 1 μM.

El procedimiento realizado, fue similar al detallado en el punto 3.2.9.b) (*Estudios de actividad a saturación de sustrato*). La única diferencia que cabe mencionar es que la serotonina fue administrada de manera pulsátil (2, 3, 4 y 6 pulsos) durante los 90 minutos de incubación, llegando a una concentración final total de 100 μM.

La serotonina se disolvió en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4 y siempre se mantuvo en hielo y protegida de la luz.

b) Efecto de serotonina en presencia de corticosterona 10 nM.

La metodología de trabajo fue similar a la detallada en el punto 3.2.9.b) (*Estudios de actividad con concentraciones no saturantes de sustrato*), con la diferencia que en el caso de los tratamiento con serotonina, ésta se administró en un único pulso al principio de la incubación o en 3 ó 5 pulsos, equidistantes en el tiempo, durante los 75 minutos de incubación.

3.2.11. ACCIÓN DE DISTINTOS ANTAGONISTAS SOBRE LA ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA MEDIADA POR SEROTONINA.

Para estudiar la especificidad de la respuesta a serotonina sobre la regulación de la actividad 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa, se realizó el siguiente protocolo:

Preincubación con:

50 μl de glicerol 87%.

4 x 10^6 células

El antagonista de los receptores de serotonina (100x), según corresponda.

Medio DMEM con alta glucosa para completar los 500 μl de incubación.

Luego de 15 minutos de preincubación a 37 °C con agitación constante y en oscuridad, se agregó al sistema:

50 μl de serotonina 20 nM, en un único pulso.

Corticosterona tritiada 10 nM final.

Luego de 75 minutos de incubación se procedió de la misma manera que lo explicado en el punto 3.1.10.b) (*Estudios de actividad con concentraciones no saturantes de sustrato).*

Los antagonistas fueron disueltos en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4 de manera de obtener concentraciones finales 100 veces mayores respecto de la concentración de serotonina utilizada. Se conservaron siempre en hielo y protegidos de la luz.

3.2.12. AISLAMIENTO DE LOS ESTEROIDES POR HPLC.

Para la separación de los esteroides por HPLC, se utilizó un equipo HPLC Spectraphysics, compuesto por bomba de inyección Spectra Series P100, detector Spectra Series UV100 e integrador Data Jet SP 4600 de Spectraphysics. Se utilizó una columna de fase reversa (μ-Bondapak C18) con la mezcla metanol:agua (3:2) empleada como fase móvil. El flujo al cual se trabajó fue de 0,8 ml/min con una presión de trabajo de aproximadamente 1.800 psi.

Se inyectaron 10 μl de la solución de estándares o 10 μl de los 25 μl totales en que se redisolvieron las muestras.

La determinación de los tiempos de retención para cada esteroide fue fundamental para la separación eficiente de los mismos. La Figura 3.2.1. muestra una corrida cromatográfica con los tiempos de retención característicos para cada esteroide, bajo la condiciones experimentales ensayadas.

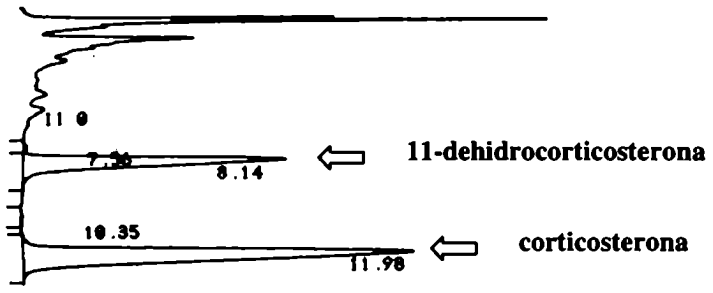


Figura 3.2.1. *Separación de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona por HPLC.* Integración representativa de los picos de elución y el tiempo de retención para cada esteroide.

Los volúmenes de elución correspondientes a corticosterona y 11-dehidrocorticosterona fueron recogidos en viales de plástico y su radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Wallac, modelo 1409 DSA).

Para el cálculo de la actividad de la 11ßHSD2, se tuvo en cuenta el porcentaje de pérdida de la extracción, tomando como 100 % el área correspondiente a cada esteroide cuando se inyectan 10 μl de los estándares en el HPLC, siendo este volumen el mismo que se incorporó a cada incubado segundos antes de la finalización de la reacción enzimática.

3.2.13. CUANTIFICACIÓN DE LOS ESTEROIDES POR HPLC

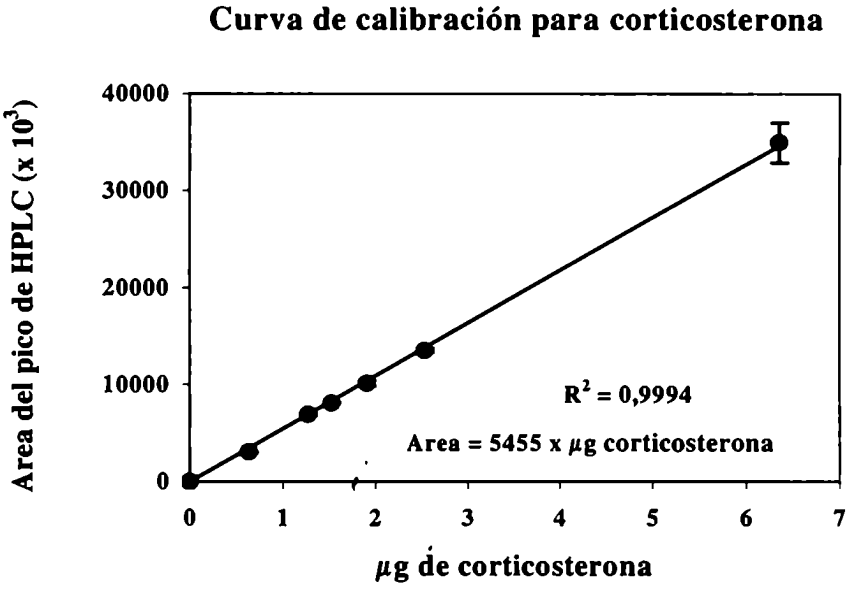


Figura 3.2.2. *Curva de calibración para corticosterona.* La curva de calibración relacionó la masa del compuesto con el área del pico de HPLC. Se presenta el algoritmo matemático para la curva.

Para la cuantificación de la masa de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona, presente en el pico de elución de las muestras, se realizó una curva de calibración con cada esteroide.

La curva de calibración relacionó masa del compuesto con el área del pico de HPLC. El área del pico obtenido por cromatografía de alta presión fue calculada por un integrador Data Jet SP 4600 de Spectraphysics. En las Figuras 3.2.2. y 3.2.3., se muestran las curvas de calibración para corticosterona y para 11-dehidrocorticosterona, dando el algoritmo matemático que relaciona la masa de la sustancia con el área del pico hallado por HPLC.

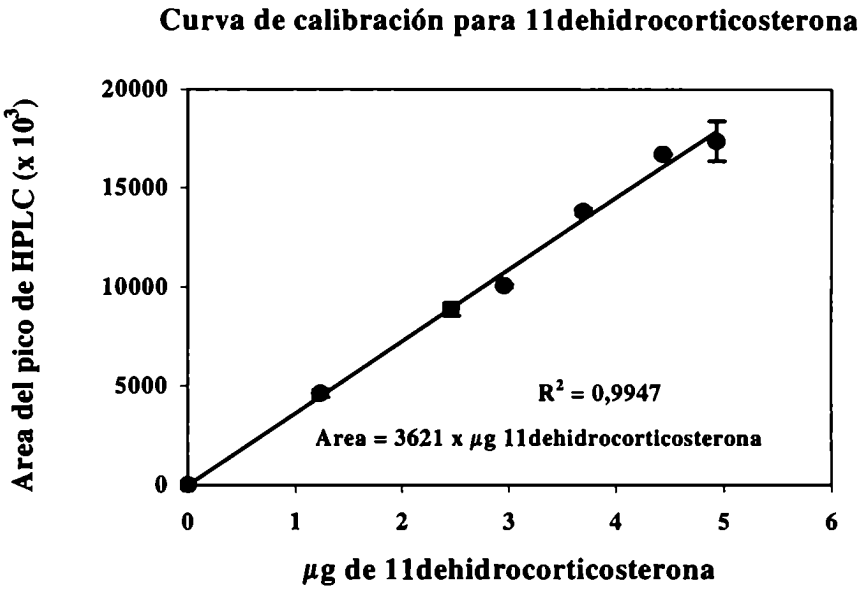


Figura 3.2.3. *Curva de calibración para 11-dehidrocorticosterona.* La curva de calibración relacionó la masa del compuesto con el área del pico de HPLC. Se presenta el algoritmo matemático para la curva.

3.2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de contrastes por Dunnett cuando se compararon varios tratamientos contra un control o por contrastes por Tukey-Kramer, cuando se realizaron comparaciones entre distintos grupos. Todos los resultados se expresan como Media ± Error Estándar (ES), donde ES es igual a la desviación estándar dividida por la raíz cuadrada del número de experimentos independientes.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa INSTAT versión 3.

3.3. CONDICIONES DE INCUBACIÓN: Descripción y Resultados.

3.3.1 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD2 CON MICROSOMAS RENALES.

Para establecer las condiciones óptimas de incubación, se tomó como punto de partida datos obtenidos anteriormente pór nuestro grupo de trabajo así como también resultados obtenidos por otros grupos de investigación [121;135;166;269]. A partir de estos, se debió ajustar la cantidad de proteína a utilizar y el tiempo óptimo de incubación, para los experimentos de cinética y actividad enzimática a punto único.

Por otro lado, se mantuvo el mismo buffer de incubación (buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4 conteniendo $MgCl_2$ 1,5 mM) y la misma concentración saturante de cofactor que fue de 400 μM, de manera de evitar que fuera el factor limitante de la reacción.

La actividad 11ßHSD2 se midió a 37 °C con agitación constante, utilizando una concentración de sustrato marcado (^{3}H-corticosterona) de 14 nM. El tiempo de incubación varió entre los 0 – 40 minutos y las concentraciones de proteínas utilizadas fueron de 500 μg/ml y 250 μg/ml (Figura 3.3.1.).

Como se puede observar en la Figura 3.3.1. la actividad enzimática se mantiene lineal hasta los 30 minutos de incubación para la concentración de 250 μg de proteína/ml.

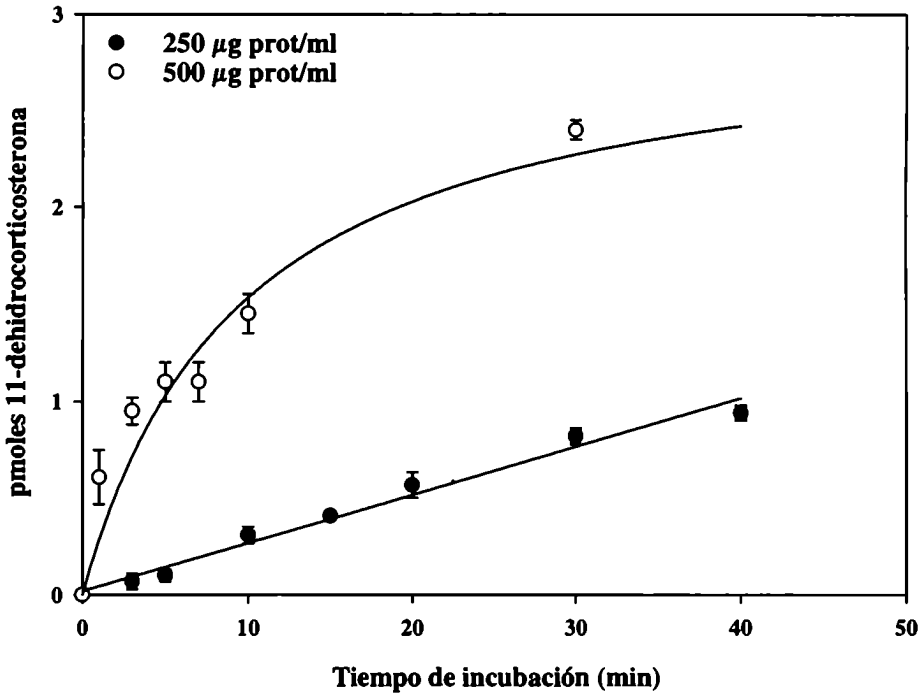


Figura 3.3.1. *Conversión de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona en presencia de 500 y 250 µg proteína/ml.* Los valores representan la Media ± ES, de dos experimentos llevados a cabo por duplicado

A partir de los resultados obtenidos se decidió elegir un tiempo de incubación de 10 minutos para una concentración de proteínas de 250 µg/ml, a 37 °C, ya que la actividad enzimática se encuentra dentro del rango lineal y además, los niveles de producto que se obtienen son fácilmente detectados por un contador de centelleo líquido.

Bajo estas condiciones de incubación (14 nM corticosterona marcada, 400 µM NAD^+ y 250 µg proteína/ml a 37 °C durante 10 minutos) y antes de comenzar con los ensayos de actividad de los distintos tratamientos, se realizó un control en donde se

midió actividad de la 11ßHSD2 en microsomas renales provenientes de animales intactos y animales expuestos a una atmósfera saturada con éter. De esta manera, nos aseguramos que las posibles variaciones observadas en cuanto a actividad en los distintos tratamientos se deben al tratamiento en sí y no a la exposición al éter. Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas entre ambos grupos (animales sin exponer a una atmósfera saturada con éter = 2,2 $\pm$ 0,2 pmoles 11-dehidrocorticosterona/mg proteína x minuto; versus animales expuestos a una atmósfera saturada con éter = 2,1 $\pm$ 0,1 pmoles 11-dehidrocorticosterona/mg proteína x minuto, n = dos experimentos independientes realizados por quintuplicado).

3.3.2 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA 11ßHSD2 CON MICROSOMAS RENALES.

Para los estudios de abundancia se puso a punto la técnica de Western-blot. Las condiciones de partida fueron tomadas de protocolos realizados dentro del grupo de investigación del cual formamos parte [29;266] y de trabajos realizados por otros autores [166]. Sin embargo, y a pesar de la información obtenida en estos trabajos, hubo que poner a punto la cantidad de proteína, el tiempo y el porcentaje del bloqueo, el tiempo de incubación y dilución de los anticuerpos y la cantidad de lavados finales, para lograr una disminución del "background" de manera tal que se visualicen las bandas eficientemente.

En una primera aproximación se realizaron corridas electroforéticas con 10 μg, 50 μg y 75 μg de proteínas. El bloqueo se llevó a cabo con leche descremada 5 % (p/v) en PBST durante toda la noche. La dilución del anticuerpo primario y del secundario fue de 1/1000 y 1/4000, respectivamente, en PBST conteniendo BSA 1 % (p/v), y la incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. A pesar de presentar un "background" elevado, se puede observar la aparición de una banda específica en aquellas calles en las cuales se sembró 50 μg y 75 μg de proteína (Figura 3.3.2.).

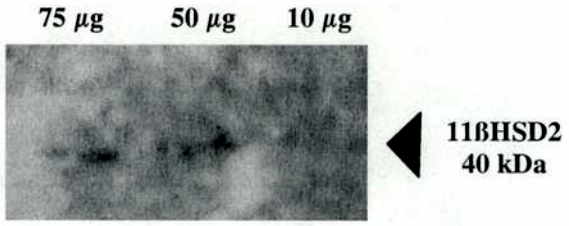


Figura 3.3.2. *Puesta a punto del Western-blot para 11ßHSD2.* Se realizaron corridas electroforéticas con distintas cantidades de proteína y se utilizó una baja dilución de anticuerpo primario para poder detectar la marca específica.

Como la membrana inespecífica prácticamente no presentó "background", y la única diferencia en cuanto al tratamiento entre la membrana inespecífica y la membrana específica es que la primera no se incuba con el anticuerpo primario, concluimos que el "background" observado en la membrana inespecífica se debía al anticuerpo policlonal utilizado. Como consecuencia de ello, se decidió repetir el ensayo de Western-blot pero cambiando las condiciones de incubación del anticuerpo anti-11ßHSD2: se incubó la membrana toda la noche a 4 °C con dos diluciones diferentes, 1/8000 y 1/5000, en PBST conteniendo BSA 1 %. Previo a la incubación con el anticuerpo primario, se realizó el bloqueo con 5 % de leche descremada disuelta en PBST, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación.

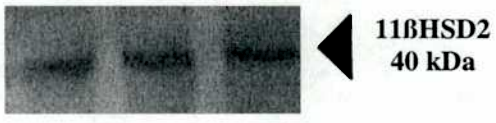


Figura 3.3.3. *Puesta a punto del Western-blot para 11ßHSD2.* Se realizaron corridas electroforéticas con distintas cantidades de proteína y se utilizó una mayor dilución de anticuerpo primario para poder detectar la marca específica con menos "background".

Los resultados se muestran en la Figura 3.3.3., en donde se observa una disminución importante del "background" cuando se incubó a la membrana con la dilución 1/8000 del anticuerpo primario.

Finalmente para lograr más disminución del "background", se decidió realizar entre 10 y 15 lavados de 5 minutos cada uno con PBST, previo al revelado de la membrana. Este último paso ayudó a lograr una mejor visualización de las bandas específicas.

Resumiendo, las condiciones óptimas elegidas para el estudio de la abundancia de la 11ßHSD2, fueron:

Siembra de 70 μg de proteína por calle.

Bloqueo con 5 % de leche descremada disuelta en PBST, 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Incubación del anticuerpo primario, dilución 1/8000 en PBST conteniendo BSA 1 % durante toda la noche a 4 °C.

Incubación del segundo anticuerpo, dilución 1/4000 en PBST conteniendo BSA 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Entre 10 y 15 lavados de 5 minutos cada uno con PBST, antes del revelado por quimioluminiscencia.

3.3.3 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD EN CÉLULAS MDCK.

La línea celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) deriva de riñón distal de perro y está formada por células que conservan algunas de las características anatómicas del tejido [285,286]. Se encuentran polarizadas [283,287,288] presentando una membrana apical y otra basolateral. La unión célula-célula es muy fuerte [284], evitando el pasaje de sustancia por difusión transcelular, es por ello que se las suele utilizar en estudios de transporte de diferentes sustancias y electrolitos [270-272,283, 287,288]. Schoeffter y col [251], mediante estudios farmacológicos con agonistas y

antagonistas de los receptores para serotonina, han podido caracterizar al receptor presente en la membrana plasmática de las células MDCK. Estos autores llegan a la conclusión que se estaría expresando el subtipo $5HT_{1D}$ y, que debido a la relativamente elevada potencia que ejerce ketanserina (antagonista clásico de los receptores $5HT_{2A}$) sobre la inhibición en la acumulación de AMPc, sugieren que se trataría del subtipo $5HT_{1D\alpha}$ o una mezcla $5HT_{1D\alpha}/5HT_{1D\beta}$.

Seckl y colaboradores [269], habían realizado estudios comparativos de la actividad deshidrogenasa presente en diferentes líneas celulares derivadas de riñón distal. En ese trabajo, dichos autores encontraron una actividad 11ßHSD2 apenas detectable en homogenatos provenientes de células MDCK, cuando utilizaban condiciones de incubación que les permitía ver una importante actividad enzimática en células $LLC\text{-}PK_1$ (células derivadas de riñón distal de cerdo).

Teniendo en cuenta los resultados hallados por estos autores, decidimos medir la actividad 11ßHSD en homogenatos provenientes de células MDCK a tiempos de incubación mayores a 10 minutos y aumentando la cantidad de proteína

a) Estudios de actividad en homogenatos de células MDCK.

Preparación de los homogenatos.

Se siguió el protocolo descripto en [269]: se removió el medio de la monocapa de células y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente las células se levantaron con tripsina 0,25 %, se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μl de buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,5 conteniendo Tritón X-100 al 0,1 % y $MgCl_2$ 2 mM. Los homogenatos fueron diluidos 1:10 en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,7 conteniendo NaCl 300 mM, EDTA 1 mM y glicerol 10 %. Las proteínas se midieron por el método de Bradford [268].

Sistema de incubación para la medición de actividad en homogenatos.

La concentración final de proteínas fue de 0,5 mg/ml o 1 mg/ml, según corresponda.

400 μM de NAD^+ (condiciones saturantes)

12 nM de corticosterona tritiada.

Volumen final de incubación 500 μl. Las incubaciones se realizaron en baño termostático a 37 °C con agitación durante 30 y 60 minutos (se realizaron los t = 0 correspondientes).

La reacción se frenó por el agregado de 2 volúmenes de acetato de etilo, se agitó y la fase orgánica superior fue removida y evaporada a sequedad bajo atmósfera de N_2. Los esteroides se resuspendieron en 70 μl de una solución de cloruro de metileno:metanol (95:5) y se procedió a sembrarlos (en punto) en placa de TLC (sílica gel 60) con indicador de fluorescencia F254. La corrida se realizó con una mezcla conteniendo cloroformo:etanol 96° (92:8) como fase móvil y al cabo de, aproximadamente, 90 minutos se detuvo el desarrollo de la cromatografía por extracción de las placas de la cuba y se realizó el revelado de las mismas por exposición a la luz UV.

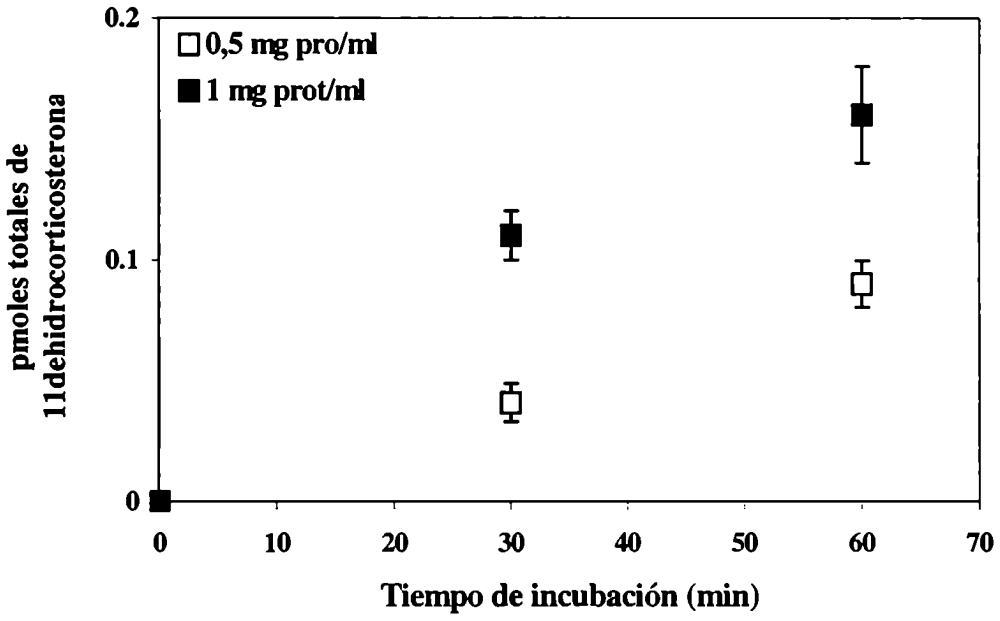


Figura 3.3.4. *Curva de tiempo para la actividad 11βHSD en homogenatos de células MDCK.* Se realizaron incubaciones a distintos tiempos y con dos concentraciones diferentes de proteínas, utilizando homogenatos provenientes de células MDCK, en presencia de 12 nM de corticosterona tritiada como sustrato y 400 μM de NAD^+, como cofactor.

Se extrajo la sílica de las zonas correspondientes a corticosterona y 11-dehidrocorticosterona, y se contó la radioactividad mediante un contador de centelleo líquido (Wallac modelo 1409 DSA).

Controles: También se realizaron incubaciones utilizando 400 μM $NADP^+$ como cofactor para la medición de la actividad 11ßHSD. En estos ensayos se obtuvieron valores de actividad similares a los obtenidos para el tiempo cero, por lo que podemos decir que no existe actividad $NADP^+$-dependiente. De esta manera se descarta la presencia de la enzima 11ßHSD1.

Como se puede observar en la Figura 3.3.4., ya a los 30 minutos existe actividad 11ßHSD2 respecto del tiempo cero. Dicha actividad es proporcional a la cantidad de proteína utilizada en la incubación y se mantiene lineal hasta los 60 minutos.

Es decir que en el trabajo realizado por Seckl y col. [269], no se observó actividad 11ßHSD2 en los homogenatos de las células MDCK, debido a que no estaban trabajando con las condiciones óptimas para ese sistema, en donde los tiempos de incubación utilizados por estos autores fueron menores.

b) Estudios de actividad en función del tiempo en células intactas.

Como nuestro interés es estudiar la regulación de la actividad 11ßHSD por diversas bioaminas, las cuales actúan a nivel de sus receptores de membrana, el siguiente paso, una vez confirmada la presencia de actividad 11ßHSD en los homogenatos, fue establecer las condiciones óptimas para la medición de la misma pero ahora, en células intactas. Para ello, se realizaron curvas producto versus tiempo con una concentración saturante de sustrato (por lo menos dos órdenes de magnitud con respecto a los valores de K_M reportados [71;138;204;266;269;273]) y variando la cantidad de células presente en el sistema de incubación. Las condiciones utilizadas para la medición de la actividad enzimática fueron las siguientes:

Glicerol 8,7 %.

1×10^6, 2×10^6 ó 4×10^6 células totales.

Corticosterona radioinerte 1 μM.

Corticosterona tritiada 5 nM.

DMEM con alta glucosa hasta completar volumen.

El volumen final de incubación fue de 500 μl. La reacción se realizó a 37 °C con agitación constante, en placas de 24 pocillos conteniendo las células en suspensión, y según lo explicado en el punto 3.2.9. El tiempo de incubación varió entre los 0 minutos y los 150 minutos.

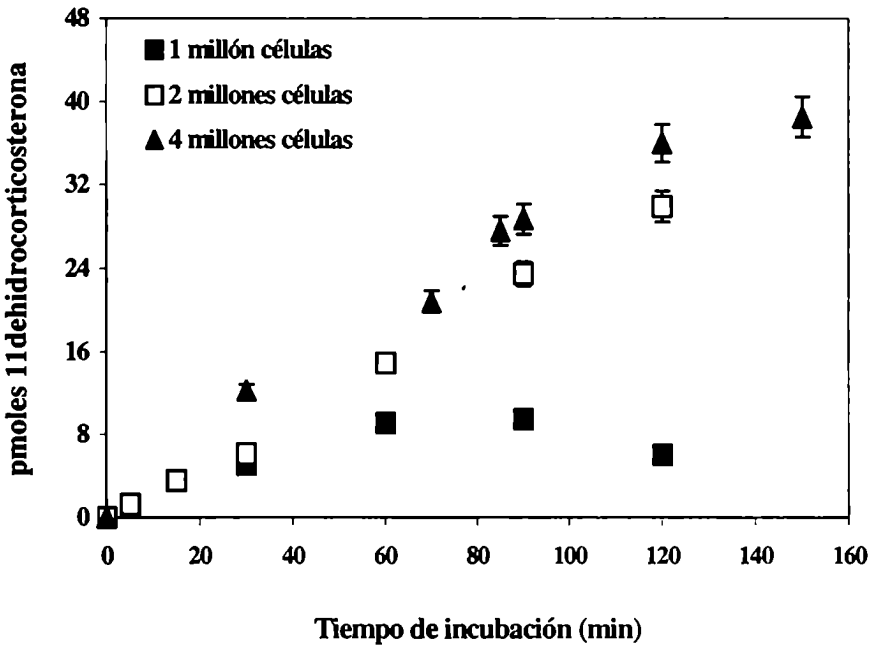


Figura 3.3.5. *Curva de producto versus tiempo con células MDCK intactas en suspensión.* Se realizaron incubaciones a diferentes tiempos y con tres concentraciones distintas de células, en presencia de 1 μM de corticosterona radioinerte y 5 nM de corticosterona tritiada.

Según los resultados observados en la Figura 3.3.5., en presencia de una baja cantidad de fuente enzimática (1 x 10^6 células) se llega, rápidamente, a saturación

mientras que en aquellas incubaciones realizadas con 2 x 10^6 o 4 x 10^6 células, la reacción se mantiene lineal hasta los 120 minutos.

3.3.4. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD EN CÉLULAS MDCK BAJO CONDICIONES NO SATURANTES.

Debido a que en condiciones saturantes se obtienen tiempos cero muy elevados, los cuales podrían estar produciendo una pérdida de sensibilidad en los ensayos de medición con serotonina, se decidió emplear una concentración de sustrato que estuviera en el orden del K_M para la enzima y dentro de las concentraciones fisiológicas [210; 219]. Teniendo en cuenta los trabajos realizados por Seckl y col. [269], se eligió una concentración final de corticosterona de 10 nM para 4 x 10^6 células y se volvió a realizar una curva de tiempo para establecer la linealidad de la reacción.

Según muestran los resultados (Figura 3.3.6.), la enzima se encuentra trabajando a velocidades iniciales durante, al menos, los primeros 90 minutos de incubación.

Tomando un tiempo de incubación de 75 minutos, se analizó la actividad 11ßHSD con diferentes cantidades de células. La Figura 3.3.7. muestra un importante incremento de la conversión de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona cuando las incubaciones se realizan con 4 x 10^6 células. Para el resto de los ensayos, sólo se evidenció un leve aumento de la actividad enzimática a pesar de la variación en la cantidad de células presentes en el incubado.

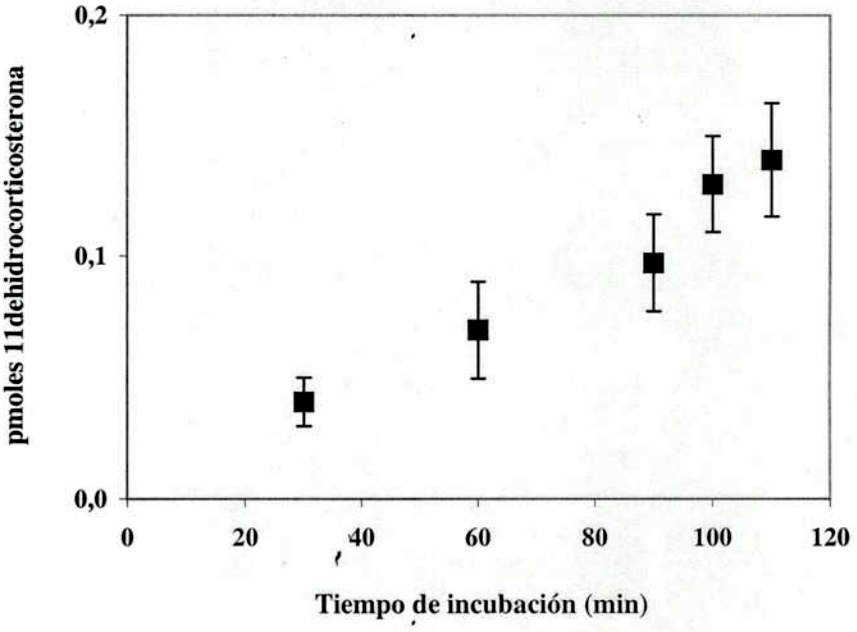


Figura 3.3.6. *Curva de tiempo para una concentración de sustrato de 10 nM.* Se realizó la incubación con 10 nM de corticosterona tritiada y con 4 x 10^6 células totales

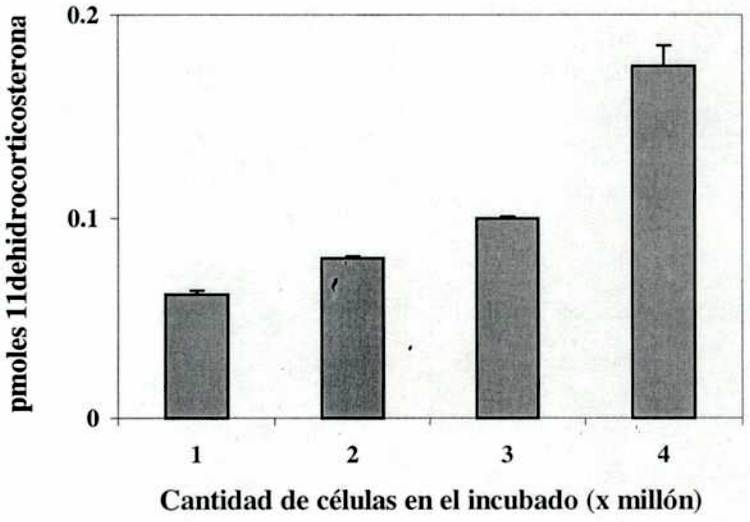


Figura 3.3.7. *Medición de actividad 11βHSD.* Se realizaron incubaciones con 10 nM de corticosterona y distinta cantidad de células.

3.3.5. CONTROLES REALIZADOS SOBRE EL SISTEMA DE INCUBACIÓN CON CÉLULAS MDCK.

1) *Identificación de los metabolitos de la corticosterona*: a partir de una preparación de células renales en suspensión, se pueden obtener dos tipos de metabolitos de la corticosterona menos polares, la 11-dehidrocorticosterona y los 5-dehidroderivados. Estos últimos se originan por la presencia de las enzimas 5α- y 5ß-reductasa *(ver Introducción punto 1.4.)*. Con el fin de confirmar que el producto obtenido a partir de la metabolización de la corticosterona era la 11-dehidrocorticosterona, se realizaron corridas en TLC utilizando como estándares a corticosterona, 11-dehidrocorticosterona y a los 5-dehidroderivados. *Resultado*: El revelado de la placa. mostró que los 5-dehidroderivados corren de manera diferencial respecto de los otros dos esteroides, especialmente respecto de la 11-dehidrocorticosterona.
2) Incubaciones en ausencia de células para evaluar la posible conversión espontánea de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona. *Resultado*: No se observó conversión espontánea.
3) Se realizaron ensayos de incubación de las células con el esteroide radiactivo y luego se realizó la extracción correspondiente, tanto del sobrenadante celular como del pellet de células. De esta manera, pudimos evaluar si el esteroide quedaba en el interior celular o salía de la célula y quedaba en el sobrenadante. *Resultado:* Hubo recuperación de radiactividad (hasta un 85 %) en el sobrenadante mientras que la radiactividad presente en el pellet no superó el ruido de fondo.
4) Incubaciones en ausencia de células con serotonina, para evaluar si *per se*, la serotonina tiene algún efecto sobre la conversión espontánea. *Resultado*: No hubo conversión de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona.
5) En el caso de la administración en pulsos de serotonina, se realizaron controles en donde se administró buffer de manera pulsátil, para evaluar si el efecto que estamos viendo es debido a la serotonina o a los pulsos en sí. *Resultado*: No hubo diferencias entre los controles (sin administración en pulsos) y las muestras tratadas con pulsos de buffer, mientras que el ensayo con serotonina sí mostró diferencias.

6) Se realizó un pasaje de serotonina por HPLC para comprobar si existía superposición con los picos correspondientes a los tiempos de retención de corticosterona y 11-dehidrocorticosterona. *Resultado*: el tiempo de retención para serotonina es mayor a 15 minutos, bajo las condiciones estándares de corrida.
7) Para evaluar que la serotonina no estuviera metabolizándose durante la incubación en baño termostático a 37 °C, se realizó un pasaje del sobrenadante por HPLC. *Resultado*: No hay metabolización de serotonina en las condiciones en que ocurre la reacción.
8) Se llevaron a cabo ensayos con las células pegadas al soporte para evaluar la posibilidad de trabajar con las células sin necesidad de tripsinizarlas. Para ello, se dejaron crecer las células hasta confluencia y se realizaron los experimentos con serotonina. *Resultado*: No hubo diferencias entre los controles y el tratamiento con serotonina. Como las MDCK son células polarizadas, es probable que los receptores para serotonina se encuentren en la cara de la membrana plasmática que interviene en la adhesión de la célula a la placa y en consecuencia, la serotonina no tiene acceso a sus receptores, por lo que no hay efecto sobre la actividad 11ßHSD.

Resultados y Discusión

Sección 4:
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD2 RENAL ANTE DIVERSAS SITUACIONES DE ESTRÉS AGUDO

La enzima 11ßHSD cataliza la conversión de corticosterona y cortisol en 11-dehidrocorticosterona y cortisona, respectivamente [23;65;66;108]. Existen dos isoformas de esta enzima, 11ßHSD1 y 11ßHSD2, productos de genes distintos [140]. Se han atribuido diversos roles para cada una de las isoformas de la 11ßHSD, dependiendo del tejido en donde se expresa (*ver Introducción*) [110-116;139].

La isoforma 1 regula los niveles intracelulares de corticosterona en hígado y riñón [66;91;139-141;144;158], mientras que en testículo de rata y, ante una situación de estrés agudo, asegura la síntesis normal de testosterona por inactivación de los glucocorticoides [139;148;157].

La isoforma 2 protege al MR, presente en los tejidos blanco de aldosterona, del exceso de glucocorticoides circulantes [118;139;71;153;167], regula el pasaje a través de la placenta de los glucocorticoides maternos [149;154;176;181], controla algunos de los efectos selectivos de aldosterona a nivel del SNC [8;91;149;164;174] e interviene, junto con la isoforma 1, en el mantenimiento del tono vascular [152;171].

Ambas isoformas se encuentran presentes en el riñón de rata [136;141;166], la 11ßHSD1 a nivel proximal y la 11ßHSD2 a nivel distal por lo que, en general, cuando se trabaja con homogenatos o fracciones microsomales provenientes de este tejido, sus actividades son discriminadas por la utilización diferencial del cofactor. Mientras que la 11ßHSD1 utiliza $NADP^+$/NADPH [35;66;90;139], el cofactor preferencial de la isoforma 11ßHSD2 es el NAD^+ [35;71;139]. De esta manera, a partir de una misma preparación microsomal renal, se puede estudiar la actividad de una u otra isoforma, variando el cofactor involucrado en la reacción.

Es poco lo que se sabe sobre la regulación de la 11ßHSD2 por factores involucrados en el estrés [29;111;187;189;210], el cual lleva a la estimulación del sistema adrenomedular y a la activación del eje HHA [3;4;205]. La escasa información

con la que se cuenta, en cuanto a la regulación de esta isoforma por los corticoides adrenales, es materia de discusión. Así, por ejemplo, Alfaidy y colaboradores [187] no observan modificaciones en la actividad 11ß-deshidrogenasa renal en animales adrenalectomizados que recibieron durante 2 hrs., 3 ó 4 días, aldosterona, corticosterona o dexametasona. Por otro lado, Li y colaboradores [111] encuentran un incremento de la actividad 11ßHSD2 renal en ratas inyectadas durante 7 días con dexametasona o desoxicorticosterona, conjuntamente con una disminución en los niveles de su mensajero. Finalmente, Diederich y colaboradores [188], hallan una inhibición de la actividad 11ßHSD2, dependiente de la dosis, mediada por glucocorticoides, en cortes de riñón humano.

Adicionalmente, se encontró que no sólo las hormonas corticoides ejercen regulación sobre la 11ßHSD2; estudios realizados en una línea celular derivada de endometrio han demostrado que la expresión y actividad de esta enzima se encuentra estimulada por el factor de crecimiento epidérmico [175]. La arginina vasopresina (AVP), también parecería estimular la actividad 11ßHSD, como ha sido observado en incubaciones de secciones de túbulo colector en presencia de AVP [190].

Asimismo, la ausencia o deficiencia en la actividad de esta enzima, produce un incremento de la presión arterial que, en algunos casos, lleva a hipertensiones arteriales severas [30;108;139;191;197]. Esto indicaría que, a nivel renal, existe una modulación en la concentración de glucocorticoides locales para evitar que estos actúen como agonistas de los MR.

Teniendo en cuenta lo dicho en los párrafos anteriores junto con lo presentado en la Introducción, uno de los objetivos propuestos en este trabajo fue analizar el efecto de distintos tipos de estrés agudo sobre la 11ßHSD2 renal.

Debieron estandarizarse muchos de los parámetros involucrados en el sistema de incubación de la actividad enzimática y en la medición de los niveles de 11ßHSD2 por Western-blot; para así poder realizar los estudios cinéticos, de actividad y de expresión enzimática, a partir de microsomas renales provenientes de los grupos de animales sometidos a los distintos tratamientos (*ver Diseño Experimental*).

4.1. ESTUDIOS CON ANIMALES INTACTOS SOMETIDOS A ESTRÉS

4.1.1. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales intactos.

Se realizaron estudios *ex vivo*, para medir la actividad de la 11ßHSD2 microsomal renal, proveniente de animales intactos sometidos a estrés agudo por sobrecarga con 10 ml de HCl 200 mM a través de una sonda bucogástrica (Intactos + acidosis) y de animales intactos sometidos a una sobrecarga simulada por la sola introducción de la sonda bucogástrica (Intactos + sonda).

Los resultados presentados en la Figura 4.1.1., muestran un aumento, al doble, de la actividad de la 11ßHSD2 en los animales estresados, en comparación con los animales intactos sin estresar. Estos resultados concuerdan con los parámetros cinéticos (Vmax) ya publicados por nuestro grupo de trabajo, para los mismos grupos de animales [266].

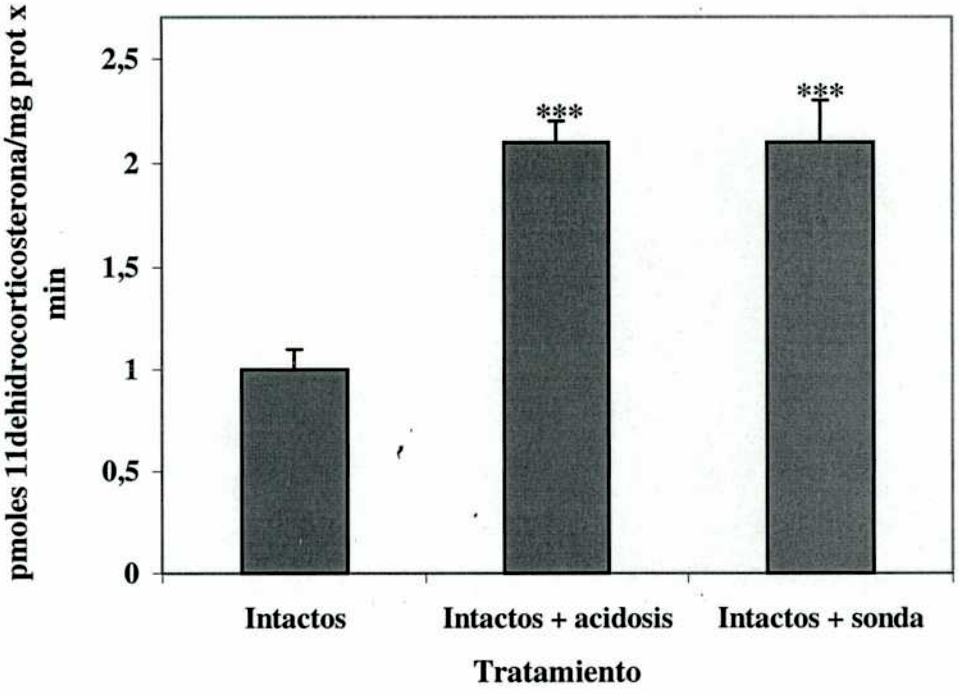


Figura 4.1.1. *Actividad de 11ßHSD2 en animales intactos estresados.* Incubaciones de microsomas renales provenientes de animales sometidos a los distintos tratamientos. Se utilizó una única concentración de [^{3}H]-corticosterona correspondiente a 14 nM. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos

experimentos independientes, realizados por quintuplicado. ***p<0,001 versus Intactos, Test de Dunnett.

4.1.2. Medición de corticosterona plasmática como indicador de estrés.

Debido a que ante una situación de estrés, el organismo responde produciendo un aumento en la síntesis y secreción de glucocorticoides circulantes, se decidió medir paralelamente, los niveles plasmáticos de corticosterona por radioinmunoensayo, como prueba de la activación del eje HHA (Tabla 4.1.1.).

Tratamiento	Corticosterona (ng/ml de plasma)
Intactos	**36 ± 3**
Intactos + sonda	**346 ± 44*** **
Intactos + acidosis	**470 ± 42*** **

Tabla 4.1.1. *Niveles de corticosterona plasmática en ratas intactas.* Previo a la remoción de los riñones se extrajo sangre de aorta para la posterior medición de los niveles de corticosterona por radioinmunoensayo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por cuadruplicado. ***p<0,001 versus Intactos, Test de Dunnett.

Según los resultados presentados en la Tabla 4.1.1., se observa un aumento de, aproximadamente, diez veces en los niveles de corticosterona plasmática en los animales estresados. Estos resultados correlacionan positivamente con el aumento de actividad observado para los mismos grupos.

4.1.3. Expresión de la enzima 11βHSD2 en animales intactos.

Posteriormente, se buscó establecer si las modificaciones en la actividad enzimática podían deberse a modificaciones en la expresión de la enzima 11ßHSD2. Para ello se realizaron estudios de Western-blot, en los cuales se evidenció un incremento en la abundancia de esta isoforma en los animales estresados (Figura 4.1.2.).

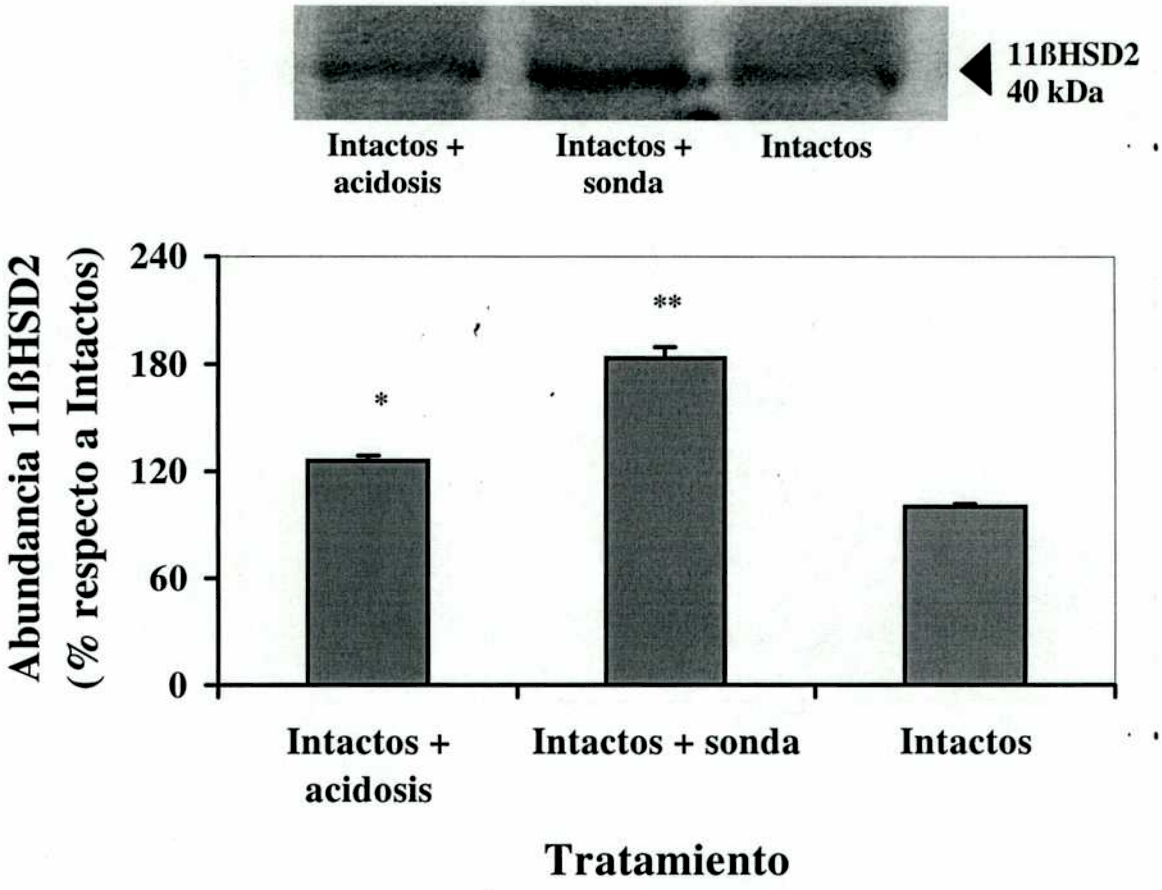


Figura 4.1.2. *Expresión de 11ßHSD2 en animales intactos estresados.* Se realizaron estudios de Western-blot a partir de microsomas renales provenientes de animales intactos sin estresar o sometidos a distintas situaciones de estrés agudo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por duplicado. *p<0,05; **p<0,01 versus Intactos, Test de Dunnett.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, podríamos decir que ante una situación de estrés, existe estimulación de la enzima 11ßHSD2 debida, en parte, a un aumento de su abundancia. Estas variaciones en la actividad enzimática podrían estar mediadas por el aumento de los niveles de corticosterona circulante que se observa como consecuencia de la estimulación del eje HHA. De esta manera, la enzima

11ßHSD2 inactivaría el exceso de glucocorticoides plasmáticos, evitando que actúen como agonistas del MR y produzcan un aumento en la retención de sodio y eliminación de potasio, con el consecuente aumento en la presión arterial.

En una segunda aproximación y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió estudiar el papel de la glándula adrenal sobre la regulación de la actividad enzimática.

4.2. ESTUDIOS CON ANIMALES ADRENALECTOMIZADOS (ADX) SOMETIDOS A ESTRÉS

Inicialmente, se prepararon cuatro grupos de animales con los siguientes tratamientos: 1) animales ADX; 2) animales Sham, a los que se les realizó una adrenalectomía simulada; 3) animales ADX a los que se les generó una acidosis metabólica por sobrecarga con 10 ml de HCl 200 mM a través de una sonda bucogástrica y 4) animales que sufrieron una sobrecarga simulada por introducción de una sonda bucogástrica.

En una segunda etapa se dispuso de un grupo adicional de animales ADX a los que se les generó una acidosis metabólica y que, además, fueron inyectados con una dosis fisiológica de corticosterona (*ver más adelante*).

Se midieron los parámetros sanguíneos, para corroborar que la administración de HCl produciría una disminución significativa del pH sanguíneo, hecho que indica que el animal se encuentra en un estado de acidosis metabólica (Tabla 4.2.1.).

Tratamiento	pH	PCO_2 (mmHg)	HCO_3^- (mM)
ADX (n = 4)	7,30± 0,02	45,7 ± 3,3	21,7 ± 0,5
Sham (n = 4)	7,36 ± 0,04	47,0 ± 3,0	25,3 ± 0,3*
ADX + acidosis (n = 6)	7,07 ± 0,03**	54,3 ± 2,6	14,0 ± 1,0**

Tabla 4.2.1. *Parámetros sanguíneos.* Antes de la remoción de los riñones, se retiró sangre de la aorta. Se midió el pH sanguíneo y la PCO_2 con un analizador MiniQ ácido-base. La concentración de bicarbonato se calculó de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Los valores se presentan como la Media ± ES del número de animales correspondiente (n). *p<0,05; **p<0,01 versus ADX, Test de Dunnett.

4.2.1. Estudios cinéticos.

Se realizaron estudios cinéticos tendientes a observar si había algún tipo de variación en la actividad enzimática de la isoforma 2 en los animales adrenalectomizados. En la Figura 4.2.1. se muestran las curvas de velocidades iniciales (Vi) en función de la concentración de sustrato para cada uno de los tratamientos y los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 4.2.2.

Como se puede observar, el grupo de animales Sham y el grupo de animales a los que se les introdujo una sonda bucogástrica (ADX + sonda) duplicaron el valor de Vmax de la 11ßHSD2 renal. Para este último tratamiento, se repitió el aumento de actividad hallado para los animales intactos sometidos a la sobrecarga simulada (Figura 4.1.1., [266]). Podemos decir que la estimulación de la 11ßHSD2 es independiente de la presencia de la adrenal o bien, que los factores secretados por ella no son los únicos que regulan la respuesta enzimática frente a este tipo de estrés.

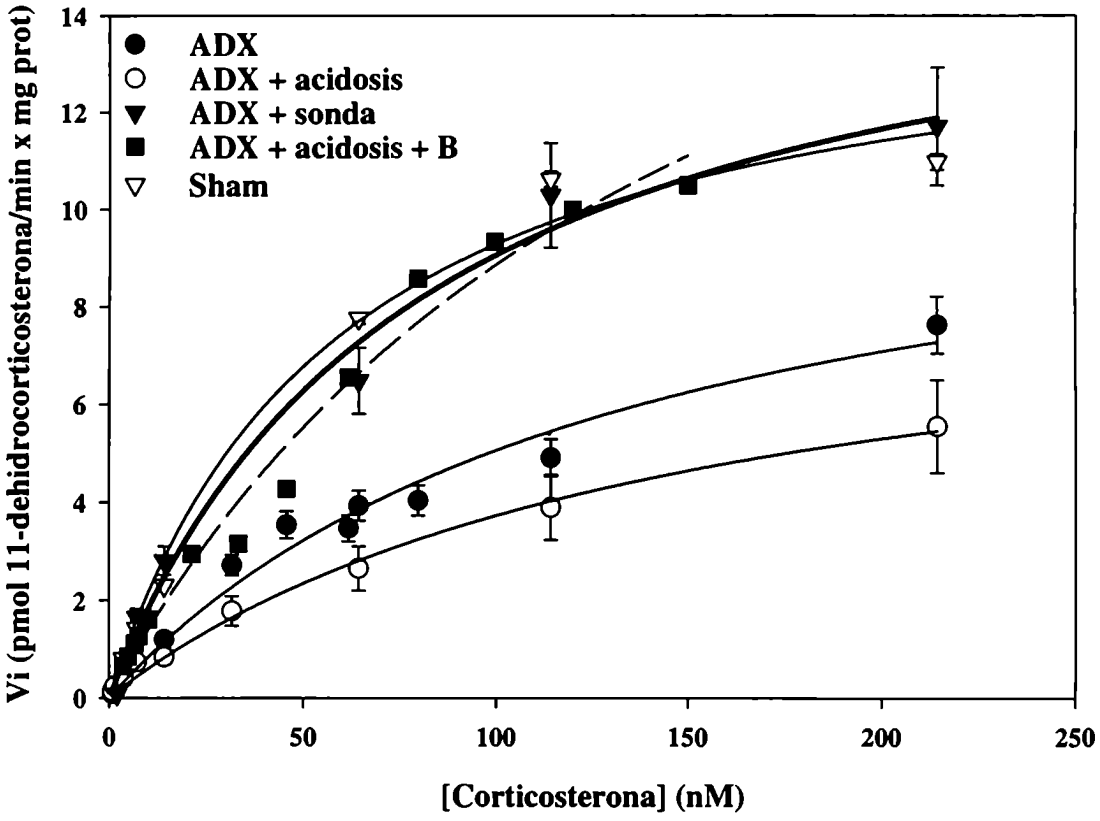


Figura 4.2.1. *Análisis cinético de la 11βHSD2 proveniente de animales estresados.* Proteínas microsomales renales de rata (250 μg/ml) fueron incubadas con concentraciones crecientes de corticosterona radioinerte y [^{3}H]-corticosterona, junto con 400 μM de NAD^+. Los valores se presentan como la Media ± ES de tres experimentos independientes, realizados por duplicado.

Por otro lado, los animales sometidos a una acidosis metabólica (ADX + acidosis) no mostraron variación en la actividad de la enzima respecto de los animales ADX, resultado que difiere con el obtenido para los animales intactos sometidos a sobrecarga con HCl, en donde se observó un aumento de la Vmax de la enzima al doble, respecto de los controles (ver cita [266] y Figura 4.1.1.). Esto nos hace suponer la necesidad de algún factor sintetizado por la adrenal para que haya respuesta por parte del organismo, frente a una acidosis metabólica.

Tratamiento	Vmax (pmoles 11dehidrocorticosterona/ mg prot x min)	K_M (nM)
ADX	5,2 ± 0,4	74 ± 9
Sham	13,7 ± 0,2**	61 ± 2
ADX + sonda	15,4 ± 1,6**	73 ± 9
ADX + acidosis	5,8 ± 1,0	61 ± 7
ADX + acidosis + B	14,0 ± 0,2**	85 ± 5

Tabla 4.2.2. *Parámetros cinéticos de la actividad 11βHSD2 en microsomas renales de animales estresados.* Los valores se presentan como la Media ± ES de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. **p<0,01 versus ADX, Test de Dunnett

Los valores de K_M obtenidos no difieren significativamente y, además, se encuentran dentro del rango nanomolar, en concordancia con los resultados obtenidos por otros investigadores [175,204;266;269;273].

4.2.2. Niveles de corticosterona plasmática.

Al igual que en el caso de los animales intactos, se midieron los niveles de corticosterona plasmática tanto en los animales con operación simulada como en los adrenalectomizados (Tabla 4.2.3.).

Como era de esperar, los animales ADX presentaron niveles muy bajos de corticosterona circulante.

Para el caso del grupo Sham, el aumento de actividad enzimática observado en la Tabla 4.2.2., se acompaña de un aumento significativo en los niveles de corticosterona circulante, en comparación tanto con el grupo ADX como con el grupo de animales Intactos. Este aumento en los niveles de corticosterona es similar al hallado para los animales intactos estresados (Tabla 4.1.1.) y confirmaría los resultados obtenidos por Udelsman y colaboradores [267]. Dichos autores demostraron que la operación quirúrgica realizada en humanos genera, *per se,* una situación de estrés, debido a la

activación del eje HHA y del sistema adrenomedular, con liberación de glucocorticoides y catecolaminas al torrente sanguíneo.

Tratamiento	Corticosterona (ng/ml de plasma)
Intactos	**36 ± 3*** **
ADX	**5 ± 1**
Sham	**310 ± 2*** +++**
ADX + sonda	**9 ± 2**
ADX + acidosis	**5 ± 1**
ADX + acidosis + B	**79 ± 8*** ++**

Tabla 4.2.3.. *Niveles de corticosterona plasmática.* Previo a la remoción de los riñones se extrajo sangre de aorta para la posterior medición de los niveles de corticosterona por radioinmunoensayo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por cuadruplicado ***p<0,001 versus ADX; ++p<0,01, +++p<0,001 versus Intactos, Test de Tukey-Kramer.

Como se dijo anteriormente, la falta de incremento en la Vmax de la 11ßHSD2 en el estrés por acidosis podría deberse a la necesidad de algún factor sintetizado y secretado por la adrenal que modulara la actividad de la enzima, ya que en los animales intactos acidóticos hay un aumento en la actividad de la 11ßHSD2 ([266], Figura 4.1.1.). Dado que la corticosterona está involucrada en la respuesta al estrés y que los glucocorticoides son necesarios para el funcionamiento normal del riñón [70;75;76;79;84], en especial en situaciones de acidosis, se decidió analizar si la corticosterona estaría regulando esta respuesta. Para ello, se realizaron estudios de actividad de la enzima 11ßHSD2 con los tratamientos anteriores pero incorporando un tratamiento adicional. Este consistió en generar una acidosis metabólica en animales ADX, previamente inyectados intramuscularmente con una dosis de corticosterona que les permite alcanzar niveles fisiológicos de glucocorticoides circulantes (ADX + acidosis + B).

4.2.3. Estudios de actividad, a punto único, de la 11βHSD2 en animales ADX.

Se realizaron ensayos de actividad, con los grupos de animales sometidos a los tratamiento anteriores junto con el grupo adicional ADX + acidosis + B. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 4.2.2.

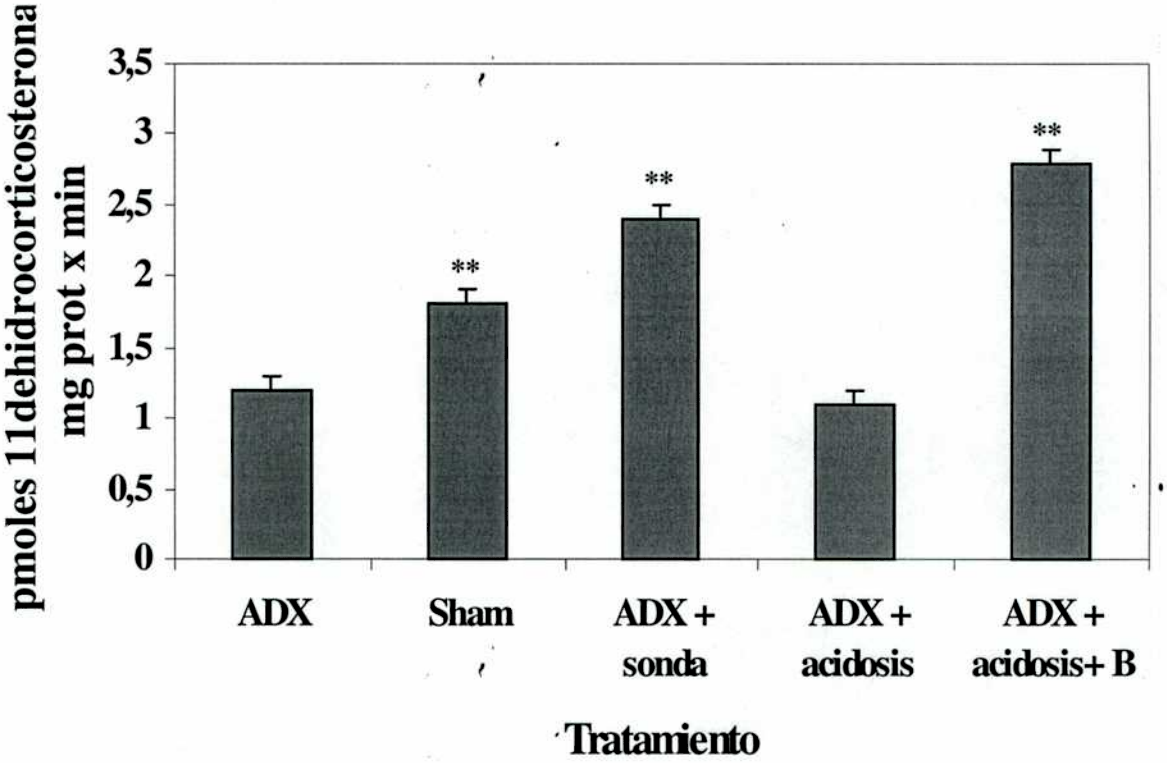


Figura 4.2.2. *Actividad de 11βHSD2 en animales ADX estresados.* Incubaciones de microsomas renales provenientes de animales sometidos a los distintos tratamientos. Se utilizó una única concentración de corticosterona tritiada correspondiente a 14 nM. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por quintuplicado **p<0,01 versus ADX, Test de Dunnett.

Como se puede observar, hay una recuperación en la actividad enzimática cuando, junto con la sobrecarga de HCl, se administra a los animales una dosis fisiológica de

corticosterona. Es decir, que los animales sometidos a estrés por acidosis necesitan de la presencia de los glucocorticoides para poder enfrentar estas alteraciones metabólicas.

Posteriormente, se realizaron estudios cinéticos con microsomas renales provenientes de este mismo grupo, los cuales mostraron un incremento en la Vmax de la 11ßHSD2, como podía suponerse a partir de los estudios de actividad a punto único (Figura 4.2.1.).

Finalmente, se analizó la posibilidad de que existan variaciones en la abundancia de esta isoforma que reflejen las modificaciones en la actividad observadas para los distintos grupos de animales.

4.2.4. Expresión de la enzima 11ßHSD2 en animales ADX.

Las variaciones en la abundancia de la 11ßHSD2 se analizaron por la técnica de Western-blot. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.2.3.

Se observa un aumento significativo de la abundancia tanto para los animales Sham, como para los que sufrieron una sobrecarga simulada o para los que fueron sometidos a una acidosis metabólica. Sólo los animales que recibieron la inyección de corticosterona junto con la sobrecarga de HCl, no presentaron un aumento significativo de la abundancia de la isoforma 11ßHSD2, respecto de los animales ADX.

Es decir que, para el caso del estrés producido por una operación simulada o por administración de una sonda bucogástrica, el aumento de actividad responde, por lo menos en parte, a un aumento de la abundancia de la 11ßHSD2. Para el caso del estrés generado por acidosis metabólica, la situación es muy distinta, ya que el aumento de abundancia sólo se observa en el caso en que no hay aumento de actividad enzimática (ADX + acidosis) y en ausencia de glucocorticoides circulantes.

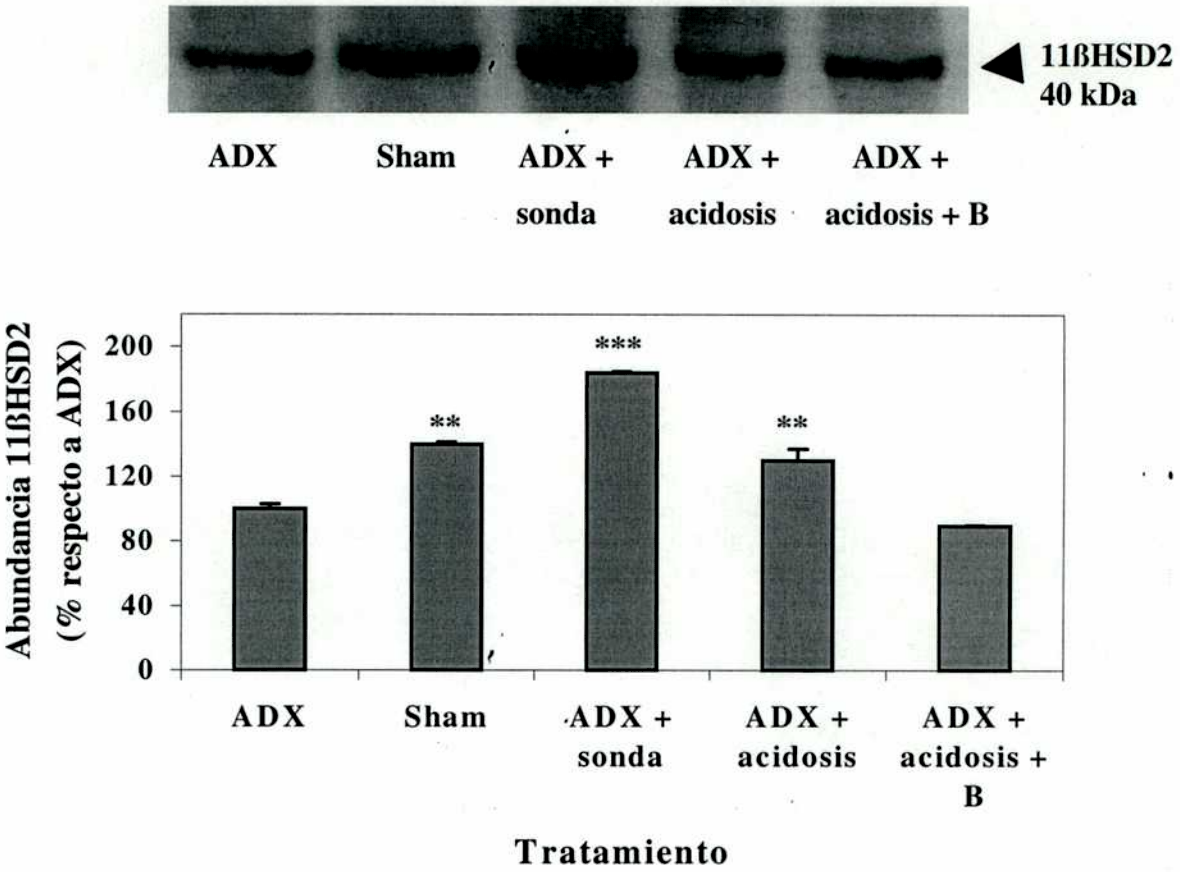


Figura 4.2.3. *Expresión de 11βHSD2 en animales adrenalectomizados estresados*. Se realizaron estudios de Western-blot a partir de microsomas renales provenientes de animales Sham, adrenalectomizados o adrenalectomizados sometidos a distintas situaciones de estrés agudo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por duplicado **p<0,01; ***p<0,001 versus ADX, Test de Dunnett.

4.3. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado en la *Introducción*, el efecto que ejercen sobre los tejidos blanco muchas de las hormonas esteroideas, se encuentra regulado a diferentes

niveles [23;65;66;108;139]. Así, existe una vía endócrina de retroalimentación negativa y/o regulación positiva, que modula la síntesis y secreción de la hormona en cuestión [24;205]. Existen, también, variaciones en los niveles de las proteínas transportadoras [66;108], que conducen a una mayor o menor biodisponibilidad de la hormona. Hay regulación en los niveles de los receptores intracelulares que llevan a una variación en la respuesta del tejido blanco [23;66]. Y, por último, existen enzimas que se encargan de la metabolización local de la hormona que llega a la célula. En la mayoría de los casos esta metabolización lleva a una potenciación del efecto de la hormona [23;66;109]. En el caso de la 11ßHSD2, la metabolización de los glucocorticoides conduce a una disminución del efecto de corticosterona y permite el libre acceso de aldosterona a sus receptores [23;65;66;108].

En este sentido, podríamos decir que la enzima 11ßHSD2 es la encargada de la modulación fina de los niveles locales de glucocorticoides en los tejidos blanco de aldosterona. Es por ello que, conocer alguno de los mecanismos de regulación de esta enzima, nos permitirá ahondar en el estudio del efecto de las hormonas corticoideas.

Sabiendo que el estrés es un potente activador del eje HHA (y del sistema adrenomedular) [2;3;24;205], en esta sección se buscó estudiar el efecto del mismo sobre la regulación de la enzima 11ßHSD2.

Los resultados de estrés agudo en animales intactos, mostraron que hay un aumento en la actividad de la enzima en todos los casos, en comparación con los animales intactos sin estresar (Figura 4.1.1.). Estos hallazgos coinciden con los estudios cinéticos anteriormente realizados y ya publicados por nuestro grupo de investigación [266]. Como era de esperar hay activación del eje HHA (Tabla 4.1.1.) debida al estrés, llegando a valores de corticosterona circulante similares a los encontrados por otros autores para diferentes tipos de estrés [116]. Como consecuencia de este gran aumento de glucocorticoides plasmáticos, es lógico pensar que a nivel renal, aumente la actividad de la 11ßHSD2 para evitar que el exceso de glucocorticoides acceda a los MR, produciendo aumento en la retención de sodio, con el conocido incremento de la presión arterial.

Esta estimulación de la actividad enzimática se debería, por lo menos en parte, a un aumento de la abundancia de la 11ßHSD2 (Figura 4.1.2.), aunque no se puede

descartar la intervención de otros factores que también regulen la respuesta del organismo frente a una situación de estrés.

Existe una correlación positiva entre la actividad, la abundancia y los niveles de corticosterona, en los grupos de animales intactos estresados.

Posteriormente, se quiso evaluar el rol que juega la glándula adrenal en la estimulación de la 11ßHSD2. Para ello, se realizaron los mismos tratamientos pero ahora, en animales previamente adrenalectomizados.

Los animales que sufrieron una operación simulada (Sham) (Tabla 4.2.2., Figuras 4.2.1. y 4.2.2.), mostraron aumento tanto en la Vmax de la enzima como en los niveles de expresión de la misma (Figura 4.2.3.), resultados similares a los obtenidos para los grupos de animales Intactos estresados. También se observó un aumento en los niveles de corticosterona circulante (Tabla 4.2.3.), en comparación tanto con el grupo ADX como con el grupo de animales Intactos, resultado que concuerda con los obtenidos por Udelsman y colaboradores [267], quienes observaron activación del eje HHA como consecuencia del estrés quirúrgico.

Los efectos observados en el grupo Sham serían dependientes de factores adrenales involucrados en la respuesta al estrés, ya que los animales ADX -quienes también sufrieron una operación quirúrgica- no presentaron un incremento en la respuesta enzimática (Figura 4.2.2.) en comparación con los animales Intactos sin estresar (Figura 4.1.1.). El hecho que los animales ADX basales presenten los mismos niveles de actividad 11ßHSD2 que los animales intactos sin estresar pone en evidencia la necesidad de algún o algunos factor/es sintetizado/s y secretado/s por la glándula adrenal en situaciones de estrés, para que se produzca el aumento de la Vmax observado en los animales Sham. Uno de estos factores podrían ser los glucocorticoides, ya que en presencia de niveles apenas detectables de corticosterona (animales ADX, Tabla 4.2.3.) o en el caso de niveles basales normales (animales Intactos, Tabla 4.1.1.), no hay aumento de la actividad enzimática. Sólo cuando se produce un incremento de, por lo menos, diez veces en los niveles de corticosterona, es cuando se observa estimulación de la actividad 11ßHSD2. Si bien no podemos descartar la intervención de algún otro factor, también relacionado con el estrés, en la regulación de la actividad enzimática en

el grupo Sham, los resultados aquí obtenidos junto con los hallados por otros investigadores [111,175,282] parecerían indicar que los glucocorticoides se encuentran involucrados en esta respuesta.

Los animales ADX sometidos a estrés por introducción de una sonda bucogástrica mostraron un aumento de la Vmax (Tabla 4.2.2., Figura 4.2.1.) que coincide con un aumento en la abundancia de la 11ßHSD2 (Figura 4.2.3.); resultados que sugieren que la estimulación de la 11ßHSD2 en este tipo de estrés estaría mediada, al menos en parte, por factores extra-adrenales.

Para el caso de los animales ADX acidóticos la explicación de los resultados obtenidos es más compleja. Evidentemente, el organismo necesita de la presencia de glucocorticoides circulantes para producir un aumento en la Vmax de la 11ßHSD2 bajo condiciones de acidosis metabólica, ya que sólo se produce incremento en la actividad enzimática en los animales intactos acidóticos (Figura 4.1.1. [266]) o en los ADX acidóticos que recibieron una dosis fisiológica de corticosterona (Tabla 4.2.2. , Figuras 4.2.1. y 4.2.2.). Teniendo en cuenta la importancia de los glucocorticoides en la hemodinamia renal [76] y en el transporte de electrolitos a través del epitelio tubular renal [70;75;79;84;98] se pueden admitir, al menos, dos explicaciones que den cuenta del comportamiento de la 11ßHSD2 frente al estrés por acidosis, las cuales no son mutuamente excluyentes. La primera, se refiere al estado de acidosis metabólica en que se encuentra el animal; la falta de adrenales y de los factores que éstas secretan, impide la recuperación del organismo frente a las alteraciones metabólicas que se producen. La disminución del pH intracelular que se observa en general, en todo el organismo, y en particular en las células renales, hace que la 11ßHSD2 actúe en condiciones subóptimas [189]. Por esto se produciría una disminución de la Vmax en los animales ADX + acidosis, que no puede ser compensada, ni siquiera, con el aumento observado en la abundancia de la misma (Tabla 4.2.2., Figura 4.2.3.). La administración de corticosterona a estos animales (ADX + acidosis + B), mejora el funcionamiento del organismo, en especial mejora la función renal, llevando a un incremento de la Vmax de la 11ßHSD2 por lo que se haría innecesario el aumento compensatorio en la expresión de la enzima. Es decir que la presencia de glucocorticoides, permitiría que el organismo

respondiese frente a una situación de acidosis metabólica, sin necesidad de modificaciones en la abundancia de la 11ßHSD2.

La segunda de las causas que explicarían el comportamiento de la 11ßHSD2 frente a una situación de acidosis, se refiere al estado de equilibrio en que se encuentra esta isoforma. Ha sido demostrado por distintos grupos de investigación [44;149;204] que la 11ßHSD2 puede hallarse como dímero inactivo o como monómero activo, en donde la relación dímero/monómero constituiría un sitio importante de regulación fina de la actividad de la 11ßHSD2, mediada por distintos agentes. Como los valores de abundancia enzimática, para cualquier proteína en general no sólo para la 11ßHSD2, no constituyen un reflejo de la actividad, podríamos suponer que si bien hay un aumento en la expresión de la isoforma 2 en el grupo de animales ADX + acidosis, la mayor proporción de ésta se encuentra como dímero inactivo y es por eso que no observamos un aumento en la Vmax, a pesar del incremento en su expresión. Contrariamente, para el caso de los animales sometidos a estrés por acidosis e inyectados con corticosterona, si bien no hay un aumento en la abundancia enzimática respecto a los animales ADX, la presencia de glucocorticoides circulantes, produciría, directa o indirectamente, un desplazamiento hacia el estado monomérico activo, razón por la cual se observaría el aumento de la Vmax sin necesidad del incremento correspondiente en su expresión. Apoyando estas conclusiones se hallan los trabajos realizados por el grupo de Krozowski [111], quienes encontraron una correlación negativa en los efectos que ejercen los glucocorticoides sobre la actividad y expresión de la 11ßHSD2, en donde la administración de glucocorticoides sintéticos produce, por un lado un aumento de la actividad 11ßHSD2 y por otro una disminución en los niveles de su mensajero. Dichos autores sugieren que esta estimulación de la actividad enzimática estaría dada por la activación de una forma latente de la 11ßHSD2 renal, mientras que la disminución en los niveles de mensajero involucraría la acción clásica de las hormonas esteroideas.

En resumen, frente al estrés por acidosis, los glucocorticoides podrían estar optimizando las condiciones del medio intracelular, para que la enzima trabaje de manera eficiente sin necesidad de un aumento en su abundancia. En ausencia de corticosterona la actividad enzimática disminuye, ya sea por alteraciones en el estado de oxidorreducción del medio intracelular o por una disminución del pH celular que, en

última instancia, llevarán a fallas en el plegamiento de la enzima y/o a un aumento de la forma dimérica inactiva en detrimento de la forma monomérica activa. Lo cierto es que no hay aumento de la actividad enzimática y el incremento que se observa en la expresión de la misma no alcanza para compensar este efecto.

Teniendo en cuenta que el estrés produce respuestas multifactoriales en el organismo que llevan a la estimulación o inhibición de diversas rutas [205] y sabiendo, además, que las vías que se inhiben o estimulan dependen del tipo de estrés aplicado [205,213-218]; no es una sorpresa haber hallado una regulación diferencial de la 11ßHSD2 renal para los diferentes tipos de estrés utilizados:

Para el caso de los animales Intactos (Intactos + sonda, Intactos + acidosis) y del grupo Sham, el estrés produce un aumento en los niveles de corticosterona circulante. A nivel renal, este incremento de 10 veces respecto de los animales Intactos sin estresar, podría estar estimulando la actividad 11ßHSD2 por aumento de su abundancia.

Frente a una situación de estrés por acidosis, la ausencia de glucocorticoides en los animales ADX, no permite que haya una estimulación de la actividad enzimática. En consecuencia el organismo, de alguna manera, trata de compensar esta falta de estimulación con un aumento de la abundancia de la enzima. La administración de corticosterona permite la recuperación de la actividad, sin aumento de la expresión de la 11ßHSD2.

El estrés generado en los animales ADX + sonda produce un aumento de la actividad y de la abundancia de la 11ßHSD2, que es independiente de la presencia de glucocorticoides circulantes. En este caso la activación de la enzima estaría regulada por factores extra-adrenales involucrados en el estrés. La modificación en los niveles de estos factores produciría una respuesta condicionada por parte de la 11ßHSD2, debido a que *a priori* no existe sustrato para ser metabolizado.

En cuanto al rol de los glucocorticoides, más allá de su acción sobre la actividad de la 11ßHSD2, estos podrían tener un efecto bifásico sobre la regulación de la expresión enzimática frente a una determinada situación de estrés. Niveles bajos de

glucocorticoides (más bajos que los necesarios para mantener las funciones fisiológicas normales [228]), producirían un aumento de la expresión de la misma como se observó en los animales ADX + sonda y ADX + acidosis. Niveles intermedios de glucocorticoides como los observados en las ratas ADX sometidas a estrés por acidosis metabólica e inyectadas con una dosis fisiológica de corticosterona (que se encuentra dentro de los valores basales normales [210;219]), podrían estar produciendo una represión directa sobre el gen de la isoforma 2 o algún tipo de regulación sobre la expresión de otro gen, cuyo producto estaría involucrado en la síntesis de la 11ßHSD2. En definitiva, estos niveles medios de glucocorticoides llevarían a una disminución en la cantidad de 11ßHSD2 presente en riñón. Finalmente, el aumento característico en los niveles de glucocorticoides debido a la estimulación del eje HHA ante una situación de estrés [116;210], como ocurre en el caso de los animales intactos estresados (Intactos + sonda, Intactos + acidosis) y en el grupo de animales Sham, llevaría, nuevamente, a un aumento en la abundancia de la enzima.

Sin embargo a pesar de existir este efecto bifásico de los glucocorticoides sobre la abundancia de la 11ßHSD2 renal, estas variaciones no se reflejarían totalmente en la actividad enzimática, ya que quedaría por ver cómo actúan los glucocorticoides sobre esta última y cuánto de la enzima presente se encuentra en estado activo.

Como consecuencia de los resultados obtenidos y con el fin de evaluar el efecto de los glucocorticoides en condiciones basales (en ausencia de estrés), se prosiguió con el estudio de la 11ßHSD2 pero ahora, en animales ADX inyectados de manera aguda o crónica con dosis crecientes de corticosterona. Los resultados se presentan en la siguiente Sección.

Sección 5:
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHSD2 RENAL POR GLUCOCORTICOIDES

Como se demostró en la sección anterior, en el caso del estrés por acidosis es necesaria la presencia de glucocorticoides circulantes para que se observe una estimulación de la actividad de la 11ßHSD2: sólo en los animales intactos acidóticos o en los animales ADX acidóticos inyectados con corticosterona hubo recuperación de la actividad enzimática (independientemente de las variaciones en la expresión de la misma).

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió estudiar el efecto de corticosterona sobre la regulación de la 11ßHSD2 renal a nivel basal (sin estresar), en un rango de concentraciones que fueron desde dosis subfisiológicas hasta dosis farmacológicas, siguiendo un protocolo de administración agudo o crónico.

5.1. REGULACIÓN DE LA 11ßHSD2 EN ANIMALES ADX INYECTADOS, EN FORMA AGUDA, CON DOSIS CRECIENTES DE CORTICOSTERONA

Las ratas ADX se dividieron en cinco grupos, cuatro de los cuales recibieron una única dosis intramuscular de corticosterona y el quinto grupo fue inyectado intramuscularmente con el vehículo en el que fue disuelta la hormona (ADX + vehículo).

A partir de los microsomas renales obtenidos de estos animales, se realizaron mediciones de actividad y de abundancia de la 11ßHSD2.

5.1.1. Estudios de actividad, a punto único, de la 11ßHSD2 en animales ADX inyectados en forma aguda con corticosterona.

Los resultados de actividad se muestran en la Figura 5.1.1.

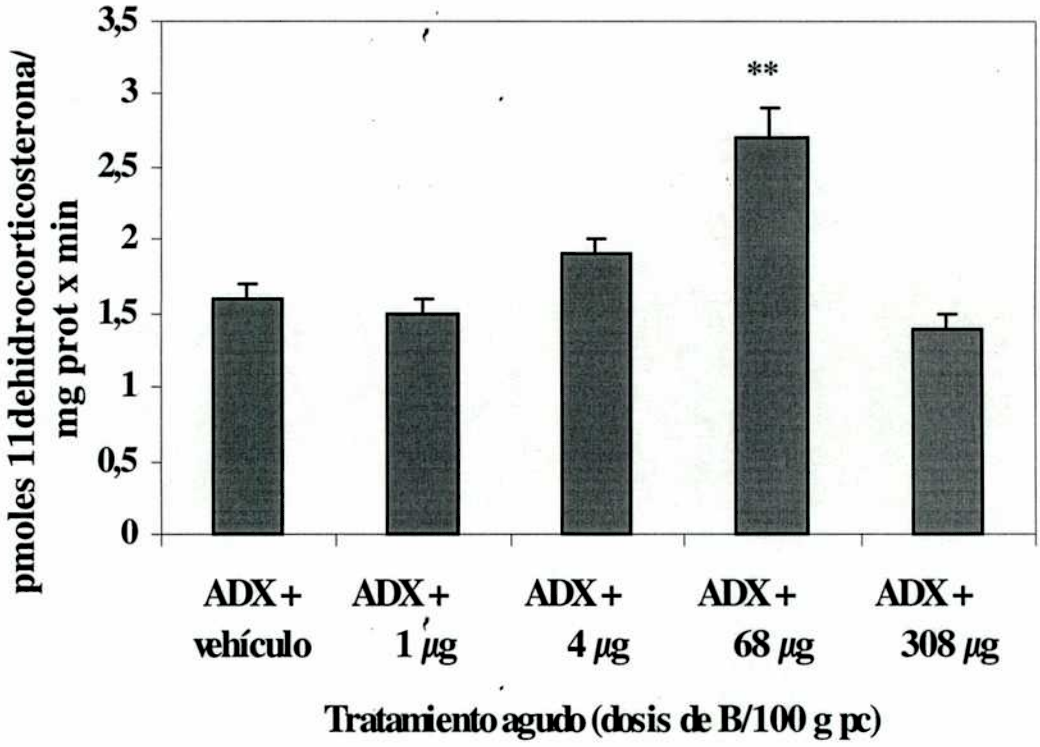


Figura 5.1.1. *Actividad de 11βHSD2 en animales ADX inyectados con dosis agudas y crecientes de corticosterona.* Incubaciones de microsomas renales provenientes de animales ADX inyectados con vehículo o con dosis crecientes de corticosterona. Para la medición de actividad se utilizó una concentración de [^{3}H]-corticosterona correspondiente a 14 nM. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por quintuplicado. **p<0,01 versus ADX + vehículo, Test de Dunnett.

Sólo con la dosis de 68 µg B/100 g. peso corporal (pc), es con la que se observa un aumento significativo de la actividad enzimática. Cabe aclarar que esta dosis de corticosterona es la misma dosis que se utilizó en la sección anterior para lograr la recuperación de la actividad en los animales ADX acidóticos (Tabla 4.2.4.).

5.1.2. Niveles de corticosterona plasmática en los ADX inyectados en forma aguda.

En la Tabla 5.1.1. se muestran las determinaciones plasmáticas de los niveles de corticosterona a los que llegan los animales al cabo de 2 hrs. luego de la inyección intramuscular.

Tratamiento agudo (dosis de B/100 g pc)	Corticosterona (ng/ml de plasma)
ADX + vehículo	2 ± 1
ADX + 1 μg	9 ± 1
ADX + 4 μg	19 ± 1
ADX + 68 μg	74 ± 8**
ADX + 308 μg	174 ± 10***

Tabla 5.1.1. *Niveles de corticosterona plasmática.* Previo a la remoción de los riñones se extrajo sangre de aorta para la posterior medición de los niveles de corticosterona por radioinmunoensayo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por cuadruplicado. **p<0,01,***p<0,001 versus ADX + vehículo, Test de Dunnett.

Con las dosis de 1 μg y 4 μg B/100 g peso corporal, se obtienen valores de corticosterona circulante que se encuentran muy por debajo de los niveles de glucocorticoides necesarios para el mantenimeinto de las funciones fisiológicas normales, como ser tamaño del timo, depósito de grasas, peso corporal, niveles de insulina circulante, presión sanguínea, etc [219].

Recién con la dosis de 68 μg B/100 g pc, se llega a niveles que se encuentran dentro del rango basal (<100 ng/ml) [210;219]. Para el caso de la dosis de 308 μg B/100 g pc, se obtienen niveles de glucocorticoides circulantes que corresponden a concentraciones plasmáticas que se encuentran entre los valores más altos observados para el pico diurno [210].

5.1.3. Expresión de la 11βHSD2.

Se realizaron los estudios de Western-blot correspondientes a cada uno de los distintos tratamientos, los resultados se presentan en la Figura 5.1.2.

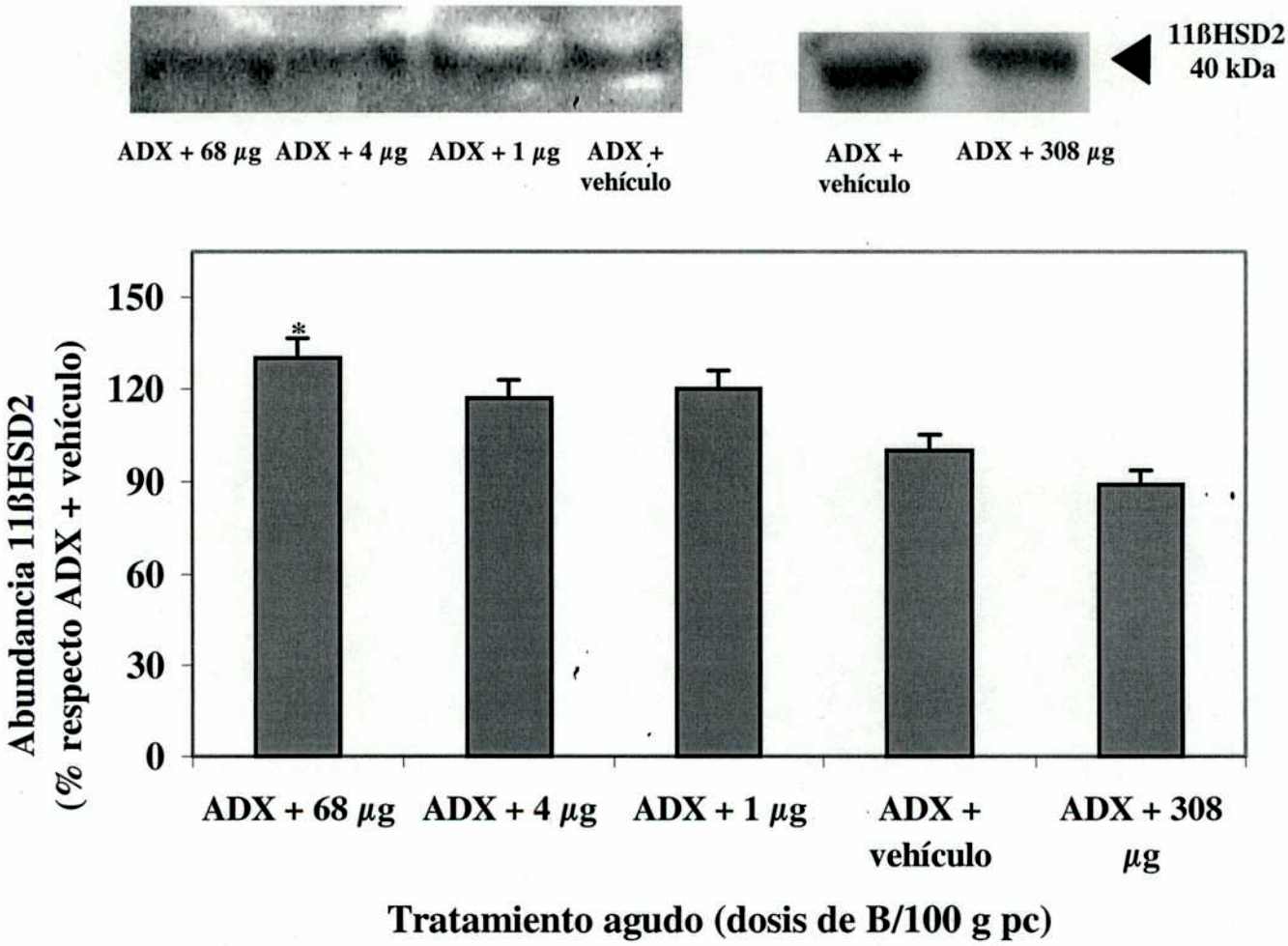


Figura 5.1.2. *Expresión de 11βHSD2 en animales ADX inyectados en forma aguda con corticosterona.* Se realizaron estudios de Western-blot a partir de microsomas renales provenientes de animales ADX inyectados con vehículo o con dosis crecientes de corticosterona. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por duplicado *p<0,05 versus ADX + vehículo, Test de Tukey-Kramer.

Si consideramos las dosis de 1 μg, 4 μg y 68 μg B/100 g pc., la abundancia de la enzima 11ßHSD2 muestra cierta tendencia a aumentar; sin embargo, dicho incremento sólo resulta significativo para la última de estas dosis. Estos resultados correlacionan positivamente con los valores de actividad obtenidos para cada una de las dosis, en donde la activación de la 11ßHSD2 sólo es significativa para la dosis de 68 μg de B/100 g pc.

Para el caso de la dosis más alta, existe una disminución, aunque no significativa, de los niveles de expresión de la 11ßHSD2, que concuerda con la disminución, tampoco significativa, de la actividad enzimática (Figura 5.1.1.).

5.2. REGULACIÓN DE LA 11ßHSD2 EN ANIMALES ADX INYECTADOS, EN FORMA CRÓNICA, CON DOSIS CRECIENTES DE CORTICOSTERONA

Se prepararon cinco grupos de ratas ADX que fueron inyectadas durante 3 días con vehículo o con las mismas dosis de corticosterona que las utilizadas para el caso de las inyecciones agudas. El objetivo fue analizar el comportamiento de la 11ßHSD2 frente a la administración crónica de glucocorticoides y compararlo con el tratamiento agudo, para establecer si existe una modulación diferencial de la enzima cuando ésta se encuentra frente a un exceso crónico de glucocorticoides circulantes.

A partir de los microsomas renales provenientes de los distintos grupos, se realizaron estudios cinéticos y de actividad enzimática a punto único, junto con estudios de abundancia de la 11ßHSD2

5.2.1. Estudios cinéticos en animales ADX inyectados en forma crónica con corticosterona.

La curvas de cinética para cada grupo se encuentran representadas en la Figura 5.2.1. y los valores de Vmax y K_M calculados a partir de dichas curvas se presentan en la Tabla 5.2.1.

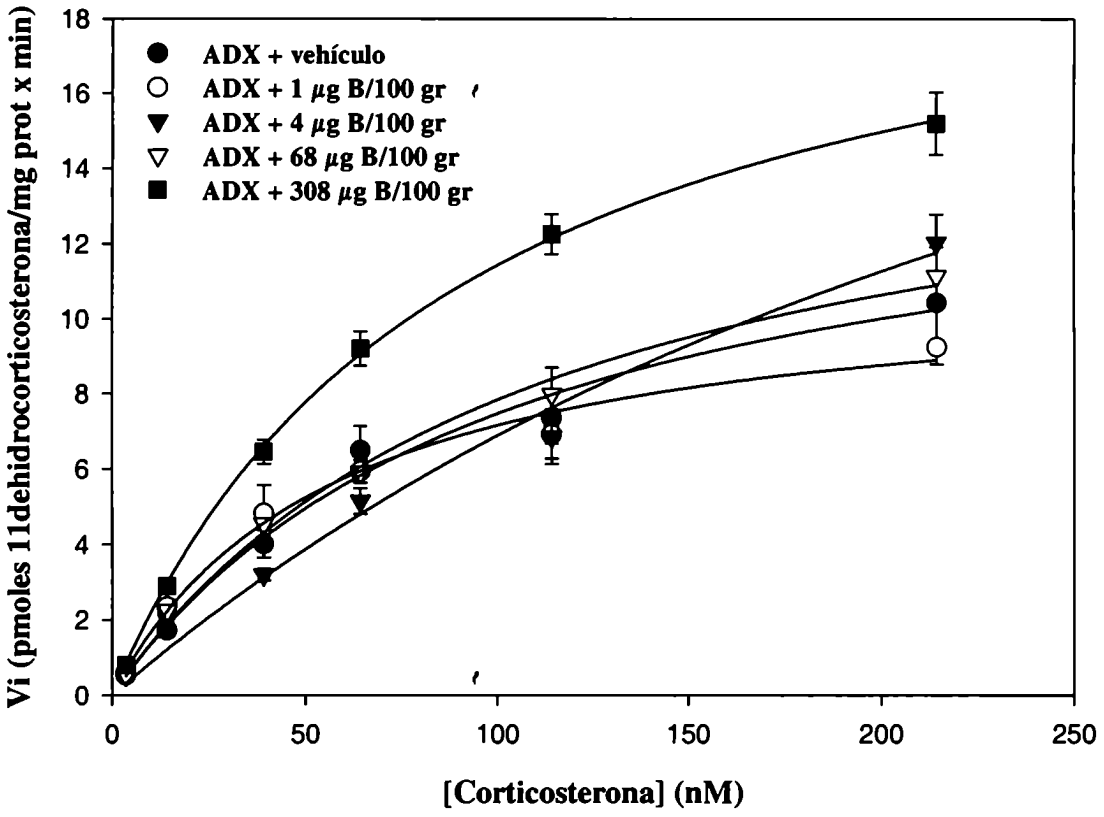


Figura 5.2.1. *Análisis cinético de la 11βHSD2 proveniente de animales inyectados crónicamente.* Proteínas microsomales renales de rata (250 μg/ml) fueron incubadas con concentraciones crecientes de corticosterona radioinerte y trazas de [^{3}H]-corticosterona, junto con 400 μM de NAD^+. Los valores se presentan como la Media ± ES de tres experimentos independientes, realizados por duplicado.

Únicamente la dosis más alta de corticosterona (308 μg B/100 g pc), es la que produce una modificación significativa de la Vmax de la enzima.

Los valores de K_M obtenidos a partir de estas curvas no mostraron diferencias significativas, y además se encontraron dentro del rango de valores que han sido publicados por otros autores [175,204;266;269;273].

Tratamiento crónico (dosis de B/100 g pc)	Vmax (pmoles 11dehidrocorticosterona/ mg prot x min)	K_M (nM)
ADX + vehículo	12 ± 1	84 ± 6
ADX + 1 μg	13 ± 1	70 ± 8
ADX + 4 μg	13 ± 1	83 ± 8
ADX + 68 μg	17 ± 2	105 ± 13
ADX + 308 μg	22 ± 1**	95 ± 1

Tabla 5.2.1. *Parámetros cinéticos de la actividad 11βHSD2 en microsomas renales de animales inyectados crónicamente.* Los valores se presentan como la Media ± ES de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. **p<0,01 versus ADX + vehículo, Test de Dunnett.

5.2.2. Estudios de actividad, a punto único, de la 11βHSD2 en animales ADX inyectados en forma crónica con corticosterona.

También se realizaron estudios de actividad a punto único a fin de poder comparar estos resultados con los obtenidos para el tratamientoa agudo. Los valores de actividad se muestran en la Figura 5.2.2.

La actividad obtenida para cada uno de estos grupos refleja las mismas diferencias observadas para los estudios cinéticos (Figura 5.2.1. y Tabla 5.2.1.), en donde existe un aumento significativo de la actividad 11ßHSD2 para los animales ADX inyectados con la dosis más elevada (308 μg B/100 g pc).

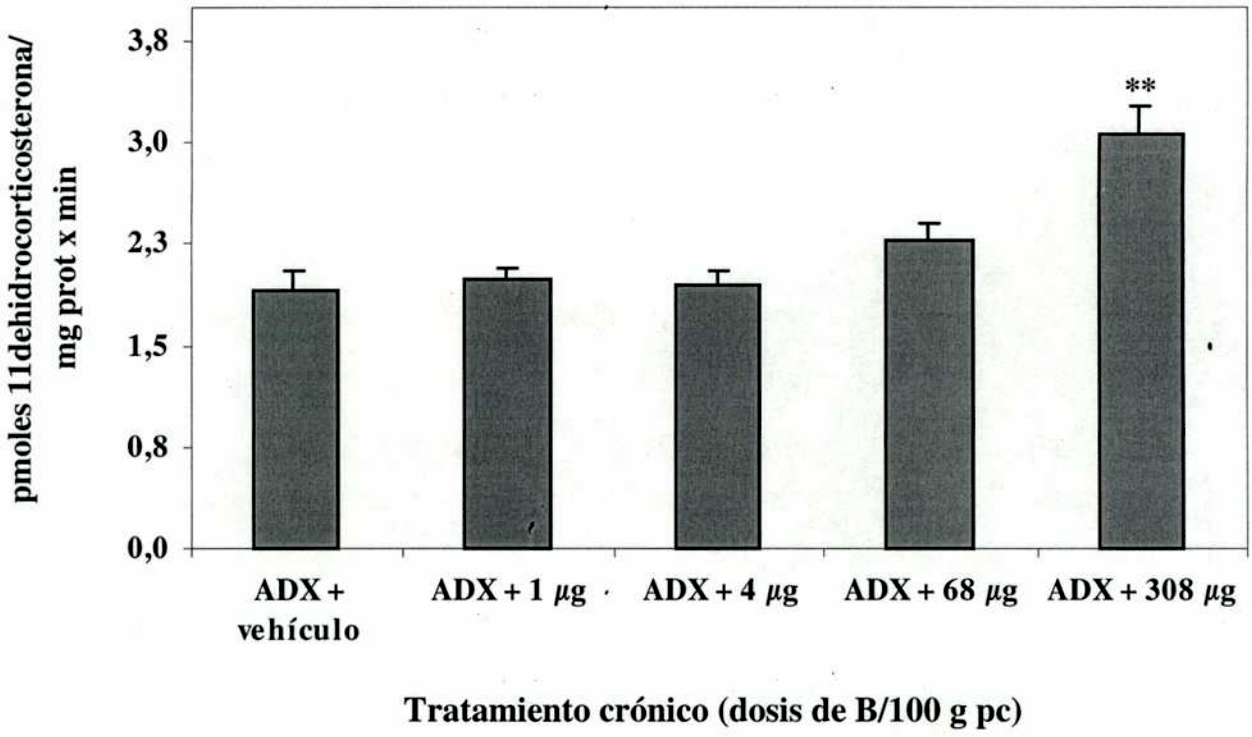


Figura 5.2.2. *Actividad de 11βHSD2 en animales ADX inyectados en forma crónica con corticosterona.* Incubaciones de microsomas renales provenientes de animales sometidos a los distintos tratamientos. Se utilizó una única concentración de corticosterona tritiada correspondiente a 14 nM. **p<0,01 versus ADX + vehículo, Test de Dunnett.

5.2.3. Niveles de corticosterona plasmática

Se midieron los niveles de corticosterona plasmática en los grupos de animales inyectados crónicamente. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.2.2.

Tratamiento crónico (dosis de B/100 g pc)	Corticosterona (ng/ml de plasma)
ADX + vehículo	5 ± 1
ADX + 1 μg	11 ± 2
ADX + 4 μg	36 ± 3§§
ADX + 68 μg	179 ± 4§§§
ADX + 308 μg	1974 ± 77***+++

Tabla 5.2.2. *Niveles de glucocorticoides plasmáticos.* Previo a la remoción de los riñones se extrajo sangre de aorta para la posterior medición de los niveles de corticosterona por radioinmunoensayo. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0,001 versus ADX + vehículo; +++p<0,001 versus ADX + 68 μg §§ p<0,01; §§§ p<0,001 versus ADX + vehículo sin tener en cuenta la dosis más alta para el tratamiento estadístico, Test de Tukey-Kramer.

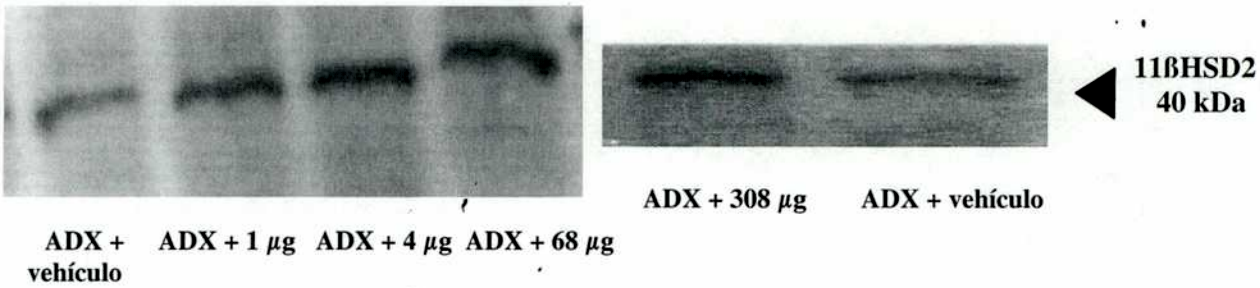
Según los valores de corticosterona plasmática obtenidos, la dosis más baja correspondería a una dosis subfisiológica, mientras que la dosis siguiente (4 μg B/100 g pc.) correspondería a una dosis fisiológica que se encuentra dentro del rango de concentraciones que permiten el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales [219]. La dosis de 68 μg B/100 g pc., representa niveles de corticosterona correspondientes al pico diurno [210] mientras que con la dosis de 308 μg B/100 g pc., se llega a concentraciones farmacológicas de glucocorticoides en sangre.

5.2.4. Expresión de la enzima 11βHSD2 en animales ADX inyectados crónicamente

Se realizaron estudios de expresión de la isofoma 2 para establecer si las variaciones que se observaron en la actividad podían deberse a cambios en la abundancia de la enzima; en especial en los animales ADX inyectados crónicamente con la dosis farmacológica.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.2.3.; en ellos se observa un aumento significativo de la abundancia para todas las dosis ensayadas. Es decir que, a pesar de observar aumento de la actividad enzimática sólo para la dosis de 308 μg de

B/100 g pc. (Tabla 5.2.1., Figuras 5.2.1. y 5.2.2.), en todos los casos hay un incremento significativo en la expresión de la 11ßHSD2.



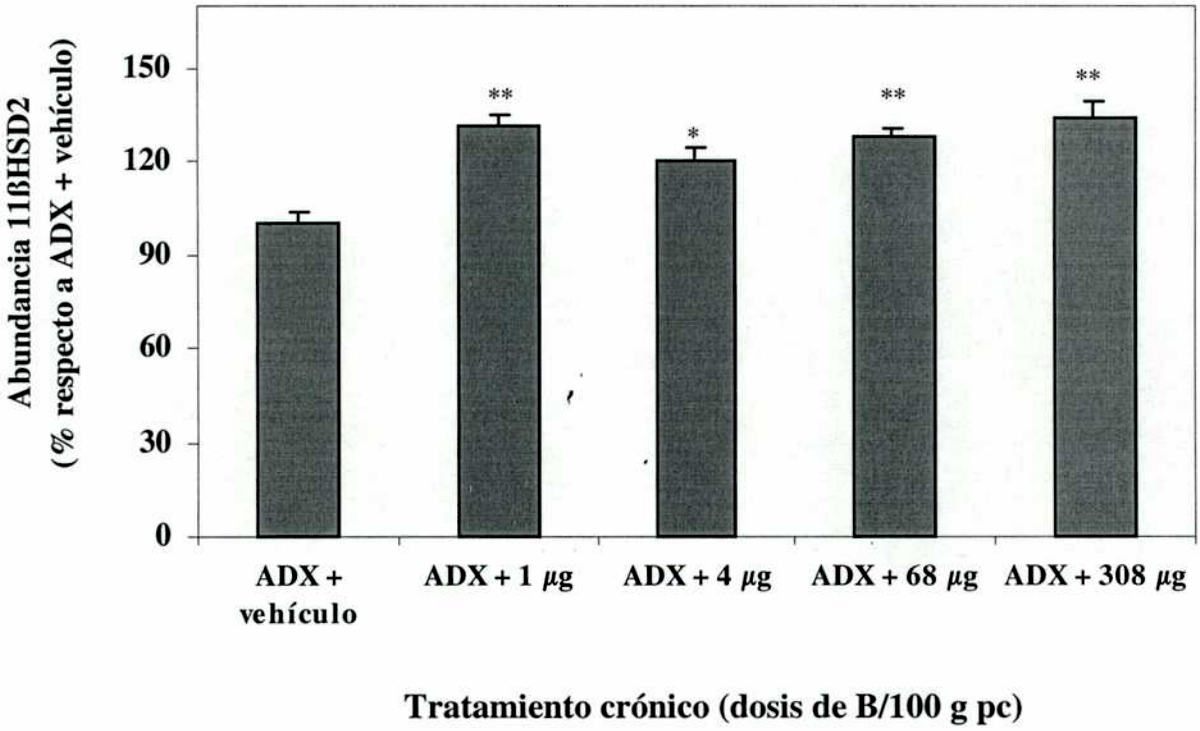


Figura 5.2.3. *Expresión de la 11ßHSD2 en animales ADX inyectados en forma crónica.* Se realizaron estudios de Western-blot a partir de microsomas renales provenientes de animales ADX inyectados con vehículo o con dosis crecientes de corticosterona. Los valores se presentan como la Media ± ES de dos experimentos independientes, realizados por duplicado. **p<0,001; **p<0,01 versus ADX + vehículo, Test de Dunnett.

5.3. DISCUSIÓN

Por lo dicho en la *Introducción* y como se ha comprobado en la Sección 4, una situación de estrés produce estimulación del eje HHA con aumento en la síntesis y secreción de glucocorticoides. Si bien este no es el único sistema que se activa ante la situación de estrés, el hecho que los glucocorticoides constituyan el sustrato de la 11ßHSD2, llevó a plantear la pregunta de si ejercerían algún tipo de regulación sobre esta enzima.

Existen muy pocos trabajos que intentan analizar el efecto de los glucocorticoides sobre la 11ßHSD2, y la mayoría de ellos resultan contradictorios en sus conclusiones [111;187;188;210,282]. Posiblemente estas diferencias se deban al sistema experimental empleado y al tipo de glucocorticoide (natural o sintético) que se utilizó para realizar los estudios.

En la Sección 4, se demostró que, ante una situación de acidosis la administración aguda de corticosterona producía estimulación de la actividad enzimática en los animales ADX, sin modificaciones en la expresión de la misma (Tabla 4.2.2 y Figura 4.2.3.). Este resultado estaría indicando que los glucocorticoides afectan, directa o indirectamente, la actividad de la 11ßHSD2. Es por eso que se decidió estudiar el efecto de distintas dosis de corticosterona, administrada en forma aguda o crónica a animales ADX sin estresar (basales), sobre la actividad y abundancia de la 11ßHSD2 renal.

Los resultados evidenciaron un comportamiento diferencial de los glucocorticoides sobre la enzima, dependiendo de la forma de administración y de la dosis.

Para el caso de las dosis agudas dentro del rango de 1 μg a 68 μg B/100 g pc., se observó tanto una tendencia a aumentar la actividad de la enzima (Figura 5.1.1) como a aumentar la expresión de la misma (Figura 5.1.2.). Sin embargo, estas variaciones fueron significativas para la dosis más elevada, es decir, para la dosis de 68 μg de B/100 g pc. Esta dosis, fue la misma que la empleada para lograr estimulación de la actividad 11ßHSD2 ante una situación de acidosis metabólica (Tabla 4.2.2) pero, contrariamente a lo observado en esa situación, en donde no hubo aumento de la expresión de la enzima (Figura 4.2.3), en este caso hubo correspondencia con un aumento en la abundancia de

la 11ßHSD2. Esta respuesta diferencial entre los animales ADX acidóticos e inyectados con corticosterona frente a los ADX basales, inyectados con la misma dosis, pudo deberse al estado de acidosis en que se encontraban los animales inyectados con corticosterona, a la acción de algún otro factor que se encuentra alterado ante una situación de estrés y que en los ADX basales inyectados no actúa o a una combinación de ambas situaciones.

La disminución en la actividad y abundancia, observada en el caso de la dosis aguda más elevada (Figuras 5.1.1. y 5.1.2.), si bien no resultó significativa, podría explicarse por una falta de adaptación del organismo. La ausencia de glucocorticoides circulantes, debido a la adrenalectomía, hace que la 11ßHSD2 se encuentre en un nivel de actividad enzimática por debajo del basal. Dicho decrecimiento, cumpliría la función de evitar que los glucocorticoides remanentes que han quedado en circulación porque todavía no fueron eliminados, o los provenientes de la reducción de la 11-dehidrocorticosterona por la enzima 11ßHSD1, sean inactivados por la 11ßHSD2.

Cuando se administra al animal, una dosis de corticosterona similar a la que se alcanza durante el pico diurno (308 μg B/100 g pc.), este aumento repentino en los niveles de glucocorticoides circulantes, toma desprevenido al organismo, que no logra contrarrestar el incremento de los niveles de corticosterona plasmática con un aumento en la actividad 11ßHSD2.

En cuanto al tratamiento con las dosis crónicas de glucocorticoides, el efecto sobre la 11ßHSD2 es diferente del observado para las dosis agudas. Hay una cierta tendencia de la enzima a aumentar su actividad (Tabla 5.2.1, Figuras 5.2.1. y 5.2.2.), pero este incremento sólo se vuelve significativo para la dosis farmacológica (308 μg B/100 g pc). Sin embargo, la abundancia de la enzima aumenta en todos los casos (Figura 5.2.3.). Esta acción de las dosis crónicas de corticosterona sobre la 11ßHSD2, se podría explicar por un efecto de "acostumbramiento" del organismo frente a la administración crónica. En este caso, a pesar de los altos niveles de corticosterona circulante, el oganismo logra adaptarse a esta situación, produciendo un aumento en la expresión y actividad de la 11ßHSD2.

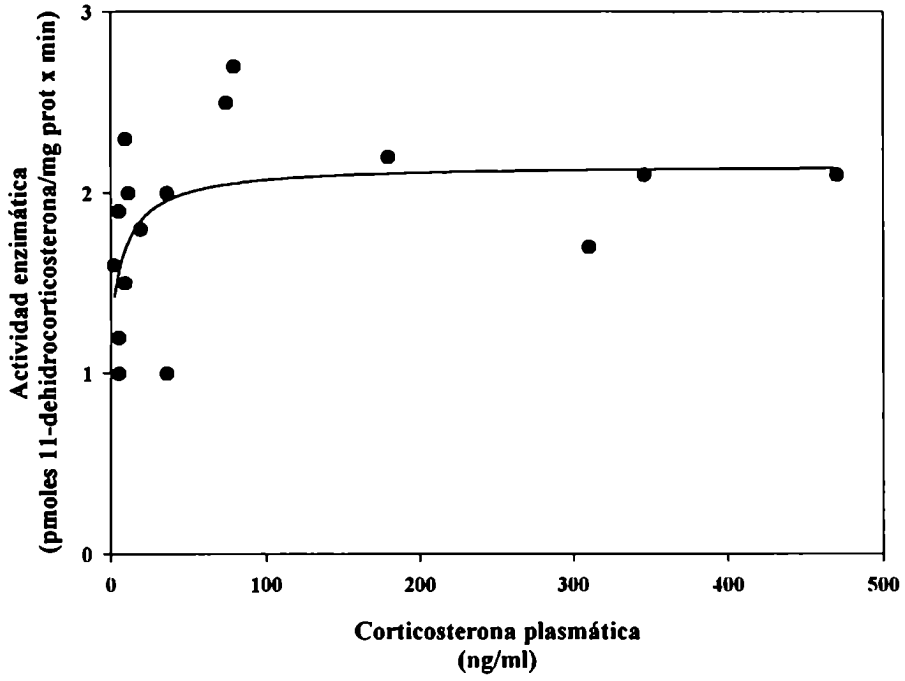
Si se comparan los niveles de corticosterona que se alcanzan con la dosis crónica de 68 μg B/100 g pc. (Tabla 5.2.2) y la dosis aguda de 308 μg B/100 g pc (Tabla 5.1.1), en

ambos casos se llega a valores muy similares (179 ng corticosterona/ml plasma *versus* 174 ng corticosterona/ml plasma). Sin embargo, para la dosis crónica hay una tendencia hacia el incremento de la actividad, con un aumento significativo en la expresión de la 11ßHSD2 (Figura 5.2.3.), mientras que la dosis aguda de 308 μg B/100 g pc., no muestra aumento en su abundancia respecto del valor control. Este efecto variable de una misma concentración plasmática de glucocorticioides, admite la siguiente explicación que se refiere al efecto adaptativo anteriormente mencionado; en donde la administración crónica hace que el organismo adquiera mecanismos compensatorios para reducir los niveles de glucocorticoides activos, mientras que la inyección aguda de una concentración elevada de corticosterona toma desprevenido al organismo, el cual se encontraba en un estado deficiente de glucocorticoides.

No hay que dejar de observar el hecho que las inyecciones tanto agudas como crónicas generan *per se,* un aumento de la actividad de la 11ßHSD2 (Tabla 5.2.1,. Figuras 5.1.1. y 5.2.2.) en comparación con los animales ADX sin inyectar de la sección anterior (Tabla 4.2.2. y Figura 4.2.2.). Este incremento en los controles, provoca que las variaciones de los tratamientos realizados con las dosis más bajas, se vuelvan estadísticamente no significativas. Si tomáramos como grupo control a los animales ADX (actividad= 1,2 pmoles de 11-dehidrocorticosterona/min x mg proteína), veríamos que para todos los tratamientos hay un incremento significativo de la actividad, salvo para la dosis aguda de 308 μg B/100 g pc. A pesar de esta variación en los resultados estadísticos, la explicación del efecto de los glucocorticoides sería la misma que la dicha anteriormente, es decir, para las dosis agudas hay un aumento progresivo de la actividad 11ßHSD2 a medida que aumenta la cantidad de corticosterona administrada, hasta la concentración de 68 μg B/100 g pc. Estos incrementos se reflejarían en la tendencia a aumentar la expresión de la enzima. Para el caso de las dosis crónicas, el efecto de acostumbramiento del organismo haría que, a medida que aumenta la concentración de corticosterona administrada, haya un aumento en la actividad y abundancia enzimática, y de esta manera a pesar de los altos niveles de corticosterona que se alcanzan con la dosis de 308 μg B/100 g pc. (1974 ng corticosterona/ml plasma, Tabla 5.2.2), el organismo logra reponerse de esta dosis farmacológica que, de otro modo, produciría un aumento de la presión arterial por la ocupación de los MR por los glucocorticoides.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, queda claro que los glucocorticoides regulan a la 11ßHSD2 renal, a nivel basal (sin existir una situación de estrés de por medio). Su intervención podría ser directa, sobre la actividad y/o abundancia de la isoforma 2; indirecta, mediada por otros factores que se encontrarían bajo la modulación de los glucocorticoides y que serían los encargados de la regulación de la 11ßHSD2; o quizás, una combinación de ambos sistemas de regulación.

Si se correlaciona la actividad enzimática con los niveles de corticosterona plasmática, se puede observar existe aumento de la actividad a medida que se incrementan los niveles de glucocorticoide circulante. Este aumento ocurre hasta una cierta concentración de corticosterona (concentración umbral) a partir de la cual la actividad enzimática ya no parece responder a los niveles de glucocorticoides.



Dicho comportamiento se observa tanto en animales intactos, con elevados niveles de corticosterona plasmática, como en animales ADX inyectados con dosis altas de glucocorticoides. Este hecho estaría indicando que, las variaciones observadas en la actividad de la 11ßHSD2 (respecto del valor control), en presencia de niveles elevados de glucocorticoides circulantes, se deberían, por lo menos en parte, a factores extra-adrenales y no a los glucocorticoides.

Tales evidencias, junto con lo demostrado para los animales ADX + sonda (Sección 4), en donde la introducción de una sonda bucogástrica producía una aumento significativo de la actividad (Tabla 4.2.2, Figuras 4.2.1 y 4.2.2) y abundancia (Figura 4.2.3) de la enzima 11ßHSD2, condujeron a la búsqueda de los posibles factores (extra-adrenales) involucrados en esta regulación.

Sección 6:
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ß-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA POR SEROTONINA

Tomando como punto de partida los resultados hallados en la Sección 4, en donde los animales ADX + sonda mostraban un aumento significativo de la actividad 11ßHSD2 (Tabla 4.2.2, Figuras 4.2.1. y 4.2.2.) y de su abundancia (Figura 4.2.3.), junto con lo presentado en la última parte de la Discusión de la Sección 5, se inició la búsqueda de posibles factores extra-adrenales que pudieran estar ejerciendo algún tipo de regulación sobre la isoforma 2.

Frente a una situación de estrés, se produce tanto la estimulación del eje HHA [2;3;205] que lleva a un incremento en la síntesis y secreción de glucocorticoides al torrente sanguíneo, como la estimulación de la médula adrenal que lleva a la síntesis y liberación de catecolaminas y serotonina [12;21;205;216;256;260-263;267]. Esta última es sintetizada a nivel periférico, no sólo por las células cromafines de la médula adrenal sino también por las células enterocromafines del sistema gastrointestinal [240], por las plaquetas [240;241] y por el riñón [243-245]. En el riñón, la serotonina se acumula en el espacio intersticial actuando de forma autócrina/parácrina sobre diversas funciones renales como la reabsorción de fosfatos a nivel proximal y modulando la acción de la hormona paratiroidea [243-245].

La serotonina es un factor que no sólo se encuentra involucrado directamente, en la respuesta del organismo frente a determinadas situaciones de estrés [260-263], sino que también actúa regulando la liberación de ACTH por la hipófisis anterior [262] y la síntesis de glucocorticoides por la glándula adrenal [21;256].

Estas evidencias permitieron plantear la posibilidad de la existencia de algún vínculo entre la serotonina sintetizada localmente por el riñón y la enzima 11ßHSD2. Así como modula la actividad del eje HHA a diferentes niveles [21;256;262], en el riñón, la serotonina podría estar involucrada en la regulación de la acción mediada por corticoides. Por ejemplo, podría modular el acceso al GR y al MR, a través de un efecto,

directo o indirecto, sobre la 11ßHSD2. Por esta razón, se eligió un modelo experimental que permitiera el estudio del efecto de serotonina sobre la isoforma 2 renal. Para ello, se utitilizó una línea celular proveniente de riñón distal de perro (MDCK), en la que se intentó establecer la posible existencia de regulación de 11ßHSD2 por serotonina. Esta línea celular posee receptores para serotonina del subtipo $5HT_{1D}$, los cuales fueron caracterizados farmacológicamente por Schoeffer y col. [251].

Primeramente, se realizó una caracterización del sistema experimental, a fin de poder realizar, posteriormente, estudios de regulación de la actividad enzimática por esta indolamina.

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA PRESENTE EN CÉLULAS MDCK

6.1.1. Estudios cinéticos

Se realizaron estudios de actividad enzimática en células intactas para la obtención de los parámetros cinéticos (Vmax y K_M) correspondientes a la actividad deshidrogenasa.

Como hasta los 90 minutos el sistema se encuentra trabajando a velocidades iniciales (*ver Diseño Experimental*), las incubaciones se realizaron durante 75 minutos en un rango de concentraciones de corticosterona de 1 nM – 40 nM.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de la Figura 6.1.1. presentaron los siguientes valores:

Vmax = 11 ± 1 fmoles 11-dehidrocorticosterona/min x mg proteína

K_M para corticosterona = 12,5 ± 0,8 nM

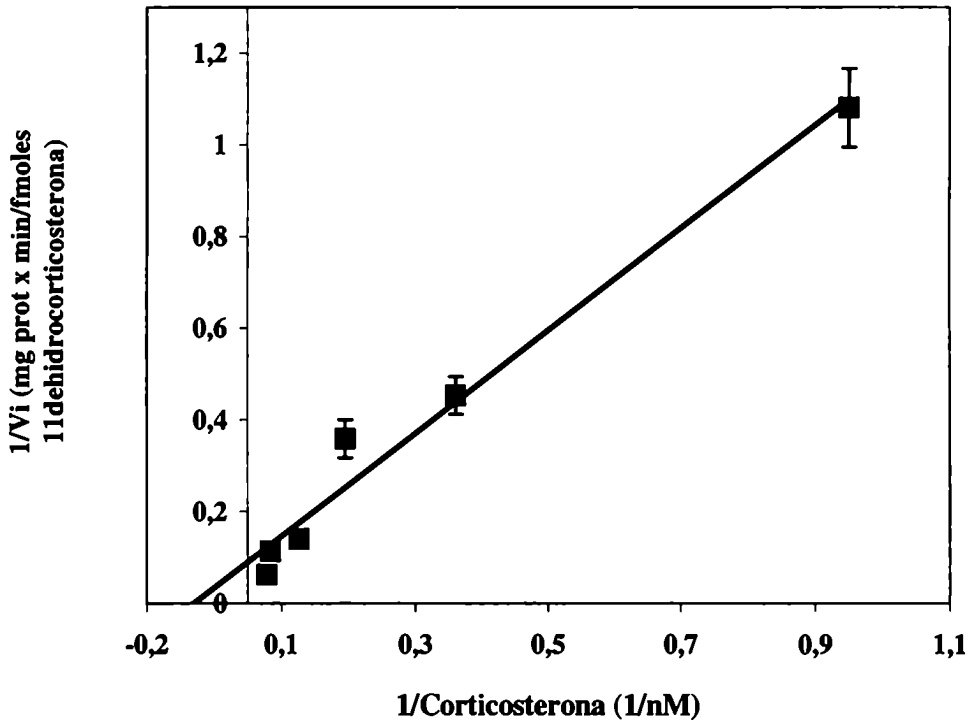


Figura 6.1.1. *Gráfico de inversas para el cálculo de los parámetros cinéticos.* Se realizaron incubaciones en presencia de concentraciones de sustrato que abarcaron un rango de 1 nM - 40 nM, durante 75 minutos. Se realizó el gráfico de inversas utilizando, para ello, la transformación lineal de Lineweaver-Burk. Los valores representan la Media ± ES de cinco experimentos independientes.

6.1.2. Estudios de inhibición

Se realizaron estudios de actividad 11ßHSD, en presencia de carbenoxolona. (CBX), un potente inhibidor de la actividad deshidrogenasa. Para ello se incubaron las células MDCK durante 75 minutos con 10 nM de corticosterona en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor.

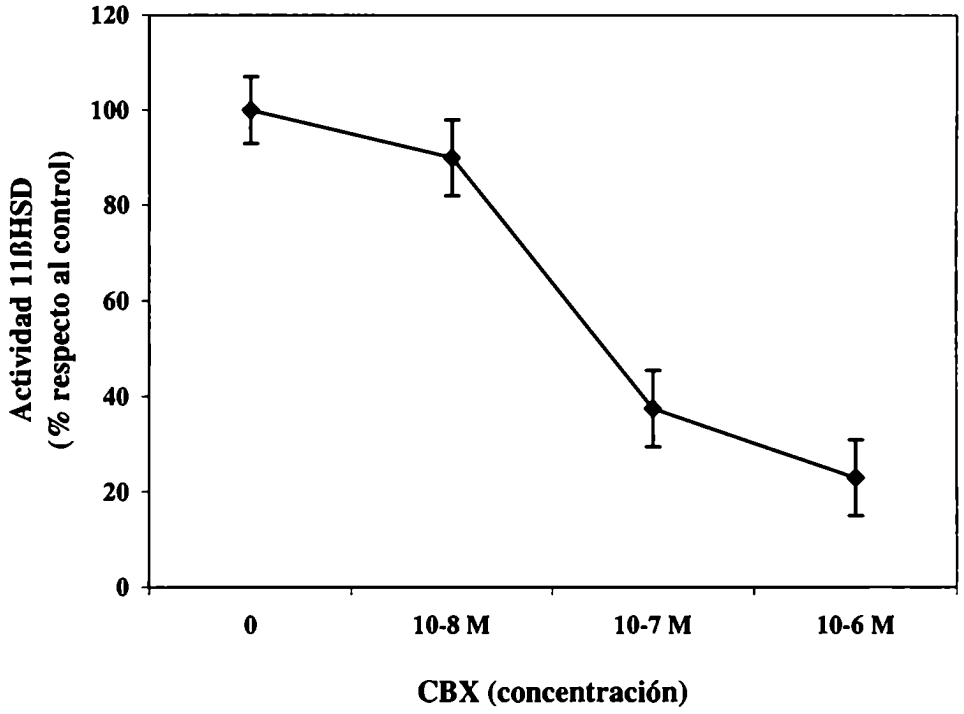


Figura 6.1.2. *Inhibición de la actividad 11ßHSD.* Las células MDCK intactas fueron incubadas en ausencia o presencia de carbenoxolona (CBX). La actividad 11ßHSD se expresó como porcentaje de actividad tomando como 100% al control sin CBX. Los valores representan la Media ± ES de cinco experimentos independientes.

La carbenoxolona inhibe la actividad 11ßHSD en células MDCK intactas con una IC_{50} cercana a 0,5 x 10^{-7} M (Figura 6.1.2.).

6.2. ESTUDIOS DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD 11ßHIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA POR SEROTONINA

6.2.1. Estudios a concentraciones saturantes de sustrato

En una primera aproximación se realizaron estudios de actividad en presencia de serotonina con concentraciones saturantes de corticosterona (dos órdenes de magnitud

respecto al valor de K_M obtenido). La incorporación de serotonina se realizó en 2, 3, 4 y 6 pulsos durante los 90 minutos de incubación, tiempo que se encuentra dentro de la linealidad para altas concentraciones de sustrato (*ver Diseño Experimental).*

En todos los casos se llegó a la misma concentración final de serotonina que fue de 100 μM.

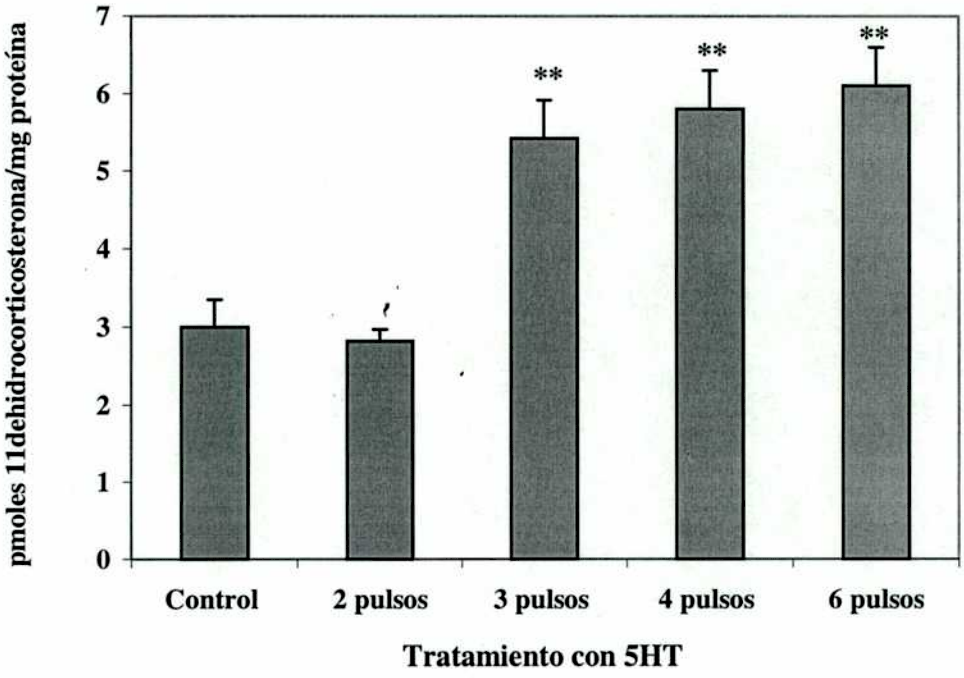


Figura 6.2.1. *Efecto de serotonina sobre la actividad 11ßHSD.* Se realizaron incubaciones con 1 μM de corticosterona radioinerte y 5 nM de corticosterona tritiada. Durante los 90 minutos de incubación se fueron agregando distintos pulsos de serotonina, equidistantes en el tiempo y tomando como tiempo inicial al tiempo = 0, para llegar a una concentración final de 100 μM. Los valores representan la Media $\pm$ ES de cuatro experimentos independientes. **$p<0,01$ versus el control, Test de Dunnett.

El agregado de serotonina en 2 pulsos no evidenció ningún tipo de cambio en la actividad 11ßHSD respecto al control, mientras que hubo estímulo de la actividad enzimática cuando la serotonina fue incorporada en 3, 4 ó 6 pulsos.

La utilización de una concentración tan elevada de sustrato (1 μM), presentó el inconveniente de la obtención de tiempos cero muy altos. Además, como se observa en la Figura 6.2.1. existe una saturación en la estimulación por serotonina, probablemente debida a que se está determinando la actividad enzimática a concentración de sustrato saturante, hecho que nos oculta las diferencias que podrían existir entre los distintos tratamientos. Por estas razones se decidió utilizar una concentración de sustrato cercana al valor de K_M obtenido, para continuar, así, con los estudios de actividad en presencia de serotonina.

6.2.2. Estudios a concentraciones subsaturantes de sustrato

Para estudiar el efecto de serotonina a bajas concentraciones de corticosterona tritiada (10 nM), se tomaron como punto de partida los resultados obtenidos en el punto. 6.2.1., en donde 100 μM de serotonina agregada en 3 pulsos, mostraba un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa. Además de la concentración de 100 μM, se utilizaron dos concentraciones de serotonina adicionales una por arriba –1 mM- y otra por debajo y cercana a los valores fisiológicos normales que se encuentran en el riñón – 10 nM [244].

Como se puede observar en la Figura 6.2.2., la concentración de 1 mM de serotonina no sólo no estimula la actividad deshidrogenasa, sino que produce una disminución en la conversión de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona. Para el caso de las otras dos concentraciones hay un aumento, significativo de la actividad enzimática.

Si bien la dosis de 100 μM de serotonina presentó la mayor estimulación de la actividad enzimática (alrededor del 190% de estimulación), no fue utilizada para la realización de los experimentos subsiguientes debido a que no se trata de una concentración que se haya detectado en el riñón en condiciones normales y, además, el deseo de realizar estudios posteriores con antagonistas competitivos de serotonina (metiotepina y ketanserina), nos obliga en cierta medida a utilizar concentraciones bajas de serotonina, ya que para poder competir con los antagonistas específicos, es necesario que éstos se encuentren, al menos, en una relación molar de dos órdenes de magnitud

respecto de la concentración de serotonina. La utilización de la dosis de 100 μM de esta indolamina traería problemas en la solubilización de los antagonistas.

Realizando una comparación entre los resultados obtenidos en la Figura 6.2.1. y la Figura 6.2.2., se puede observar que el fenómeno de saturación observado en la primera figura ocultaba, en parte, la respuesta a la serotonina, la cual queda al descubierto al utilizar una concentración de sustrato que está dentro de los valores del K_M. La estimulación de la actividad enzimática del 80% obtenida con 100 μM de serotonina administrada en 3 pulsos y con una concentración de corticosterona de 1 μM (Figura 6.2.1), se incrementa al 190% cuando en el sistema de incubación se utiliza una concentración de sustrato de 10 nM (Figura 6.2.2).

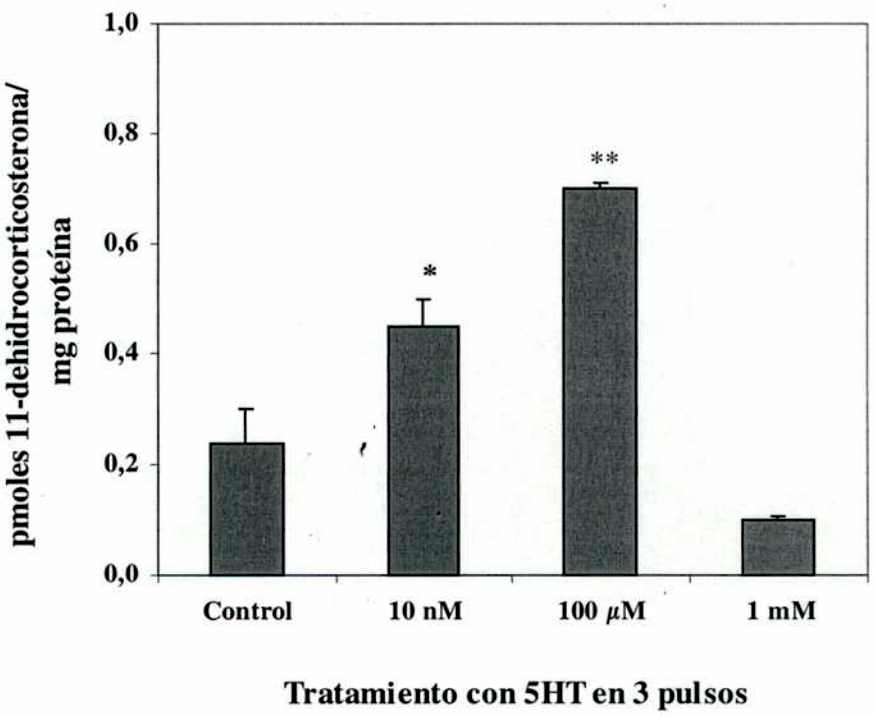


Figura 6.2.2. *Efecto de distintas cantidades de serotonina agregada en 3 pulsos, sobre la actividad 11βHSD.* Se realizaron incubaciones con 10 nM de corticosterona tritiada, durante 75 minutos. Se incorporaron pulsos de serotonina a los t=0, t=25 y t=50 llegando a una concentración final de la misma de 10 nM, 100 μM y 1 mM. Los valores representan la Media $\pm$ ES de tres experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01 versus el control, Test de Dunnett.

Dado que 10 nM de serotonina es una concentración que se encuentra dentro de las dosis fisiológicas medidas en el riñón [244], y una vez establecida la existencia de estimulación de la actividad enzimática por esta dosis, se analizó si un aumento en la frecuencia de pulsos de serotonina podía producir un incremento mayor de la actividad 11ßHSD. Este efecto ya había sido observado en la Figura 6.2.1. en donde 2 pulsos de serotonina no mostraban estimulación mientras que 3, 4 y 6 pulsos (que llevan a la misma concentración final de serotonina) evidenciaban un aumento de la actividad enzimática de aproximadamente el 40%.

La administración de serotonina 10 nM en 5 pulsos, produjo un aumento del 100% en la actividad 11ßHSD respecto de los valores del control (Figura 6.2.3.). Es decir, que hubo un incremento en la estimulación de la actividad enzimática de más del 10% entre la administración de serotonina 10 nM en 3 pulsos (Figura 6.2.2.) y en 5 pulsos (Figura 6.2.3.).

Si se comparan las Figuras 6.2.2. y 6.2.3., se observa un desplazamiento de la curva de estimulación hacia la izquierda, cuando se aumenta la cantidad de pulsos en que se administra la serotonina. El máximo de estimulación observado para los 100 μM administrados en 3 pulsos (Figura 6.2.2.), se desplaza hacia la izquierda cuando la administración de serotonina se realiza en 5 pulsos, presentándose para la concentración de 10 nM de serotonina, mientras que la concentración de 100 μM administrada en 5 pulsos no muestran diferencias respecto al control (Figura 6.2.3.).

Los resultados con serotonina presentados hasta el momento parecerían indicar que, para observar estimulación de la actividad 11ßHSD no sólo es importante la concentración de serotonina agregada, sino también la relación número de pulsos : masa de serotonina por pulso. Es decir que en la activación enzimática cumplirían un rol importante tanto la frecuencia de los pulsos como la cantidad de serotonina que llega a cada célula.

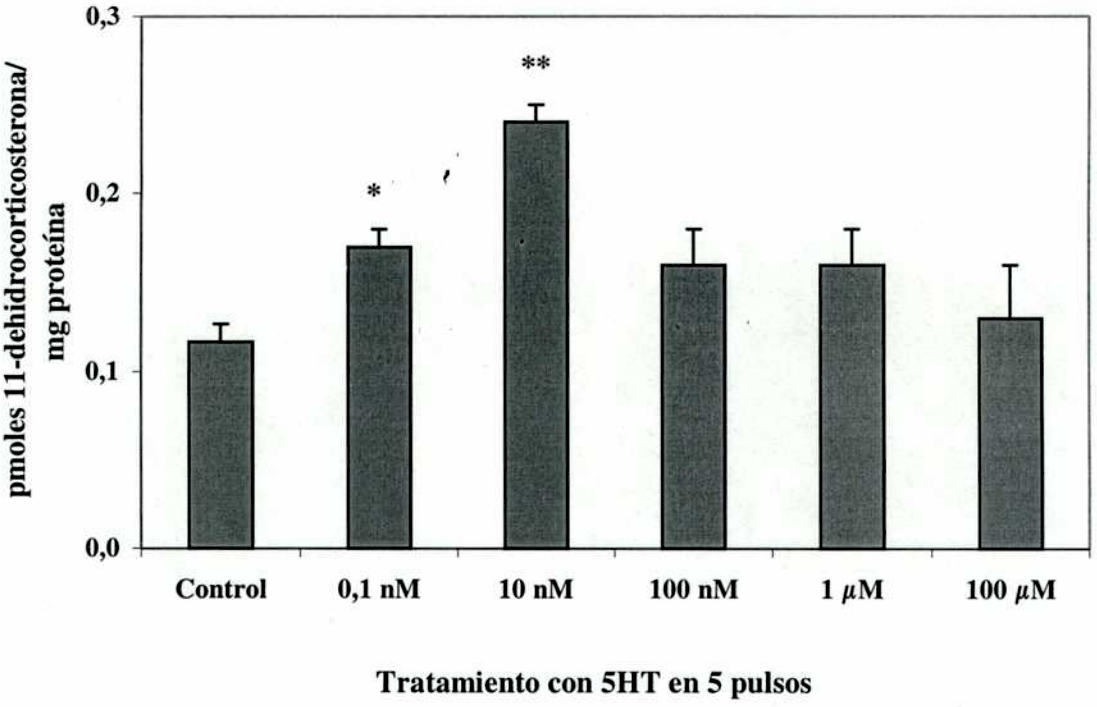


Figura 6.2.3. *Efecto de distintas cantidades de serotonina, agregada en 5 pulsos, sobre la actividad 11ßHSD.* Se realizaron incubaciones con 4 x 10^6 células y 10 nM de corticosterona tritiada, durante 75 minutos. Los pulsos de serotonina, se adicionaron a los t=0, t=15, t=30, t=45 y t=60 minutos. Las concentraciones finales de serotonina a las que se llegó fueron: 0,1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM y 100 μM. Los valores representan la Media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01 versus el control, Test de Dunnett.

Para evaluar la dependencia de la estimulación de la actividad 11ßHSD de acuerdo a la cantidad de células presentes en el sistema de incubación, se realizaron curvas de actividad enzimática con dos concentraciones distintas de células (2 x 10^6 y 4 x 10^6 células/500 μl) y con cantidades crecientes de serotonina, agregadas en 5 pulsos. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 6.2.3. y 6.2.4.

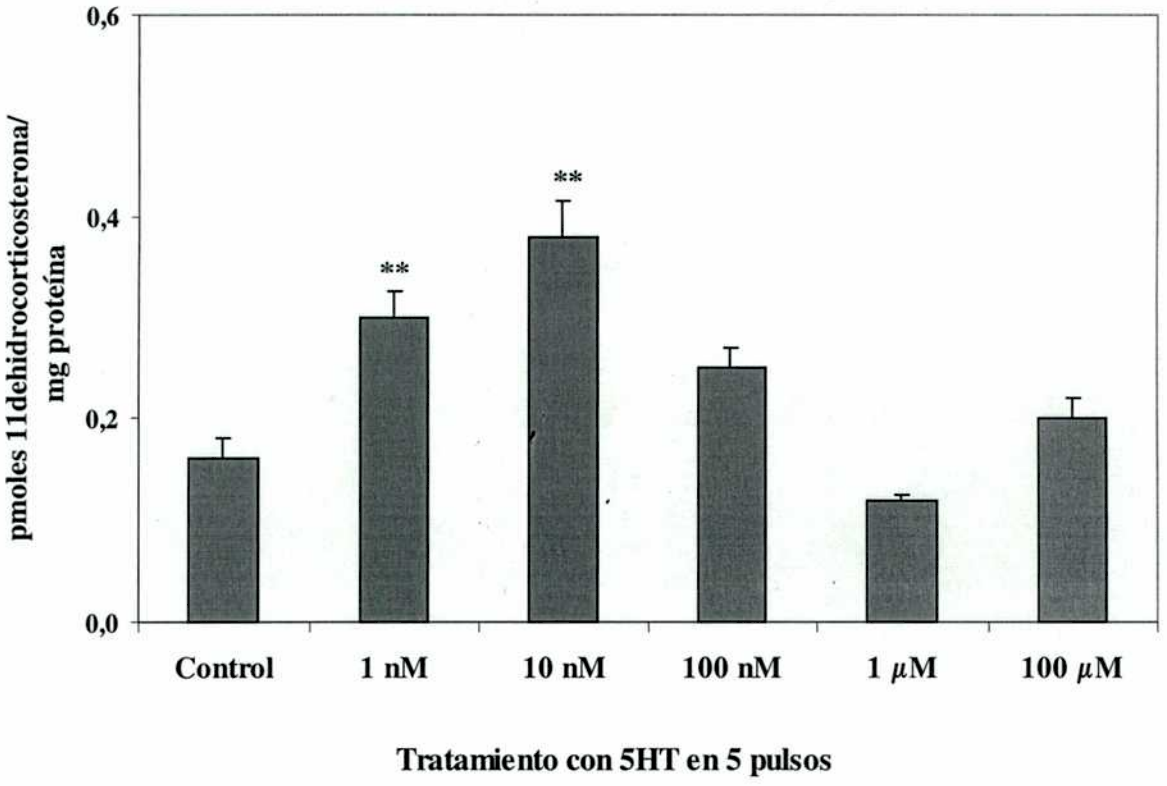


Figura 6.2.4. *Efecto de distintas cantidades de serotonina, agregada en 5 pulsos, sobre la actividad 11βHSD.* Se realizaron incubaciones con 2 x10^6 células y 10 nM de corticosterona tritiada, durante 75 minutos. Los pulsos de serotonina, se adicionaron a los t=0, t=15, t=30, t=45 y t=60 minutos. Las concentraciones finales de serotonina a las que se llegó fueron: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM y 100 μM. Los valores representan la Media ± ES de cinco experimentos independientes. **p<0,01 versus el control, Test de Dunnett.

Los resultados obtenidos con dos concentraciones de células mostraron el máximo de estimulación a la misma concentración de serotonina de 10 nM. Esto nos muestra que, a las concentraciones de células utilizadas, la concentración de serotonina necesaria para alcanzar la respuesta máxima, es la misma.

Recalculando los valores como estímulo respecto del basal (Figura 6.2.5), se puede observar que ambos sistemas no sólo presentan el mismo comportamiento, cualitativamente hablando, sino que logran los mismos niveles de estimulación de la

actividad enzimática. Por lo tanto, se puede considerar que la concentración de serotonina 10 nM, daría la máxima respuesta en este sistema para, luego, disminuir a concentraciones mayores, probablemente desensibilizantes.

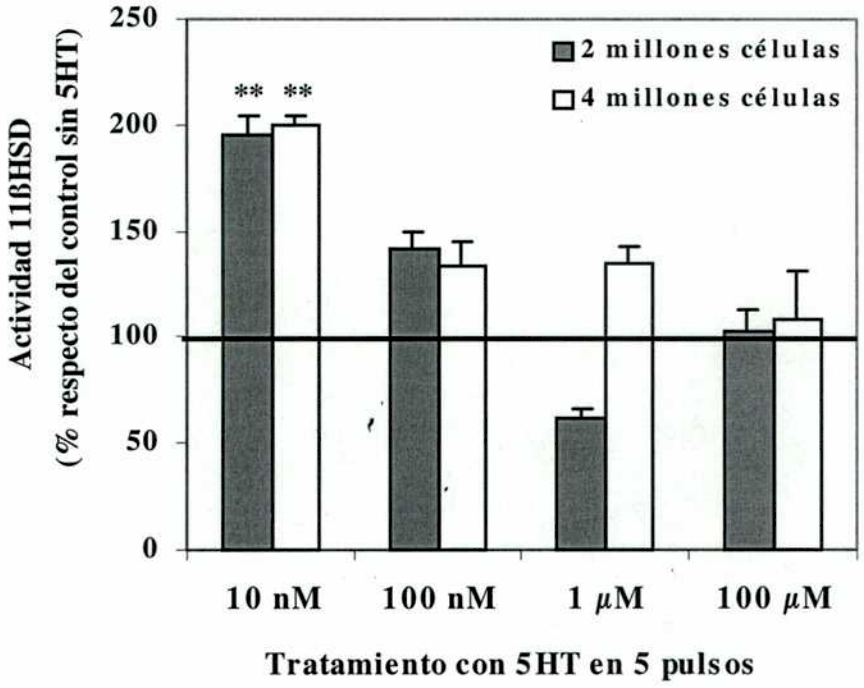


Figura 6.2.5. *Calculo del porcentaje de actividad en presencia de serotonina, con 2 x 10^6 y 4 x 10^6 células.* Se calculó el porcentaje de actividad 11ßHSD a partir de los experimentos provenientes de las Figuras 6.2.3. y 6.2.4. Se tomó al control como 100% de actividad. **p<0,01 versus el control sin serotonina, Test de Dunnett.

A fin de evaluar la importancia de la relación, mencionada anteriormente, entre concentración final de serotonina, frecuencia de pulsos y masa agregada por pulso, se decidió implementar otra estrategia. En lugar de variar la cantidad de células en el incubado, se varió la forma de administración de serotonina. Teniendo en cuenta que 5 pmoles de serotonina, administrada en 5 pulsos de 1 pmol cada uno, producen la máxima estimulación, entonces se quiso ver qué sucedería si se administrase un único pulso de 1 pmol (1/5 de la dosis).

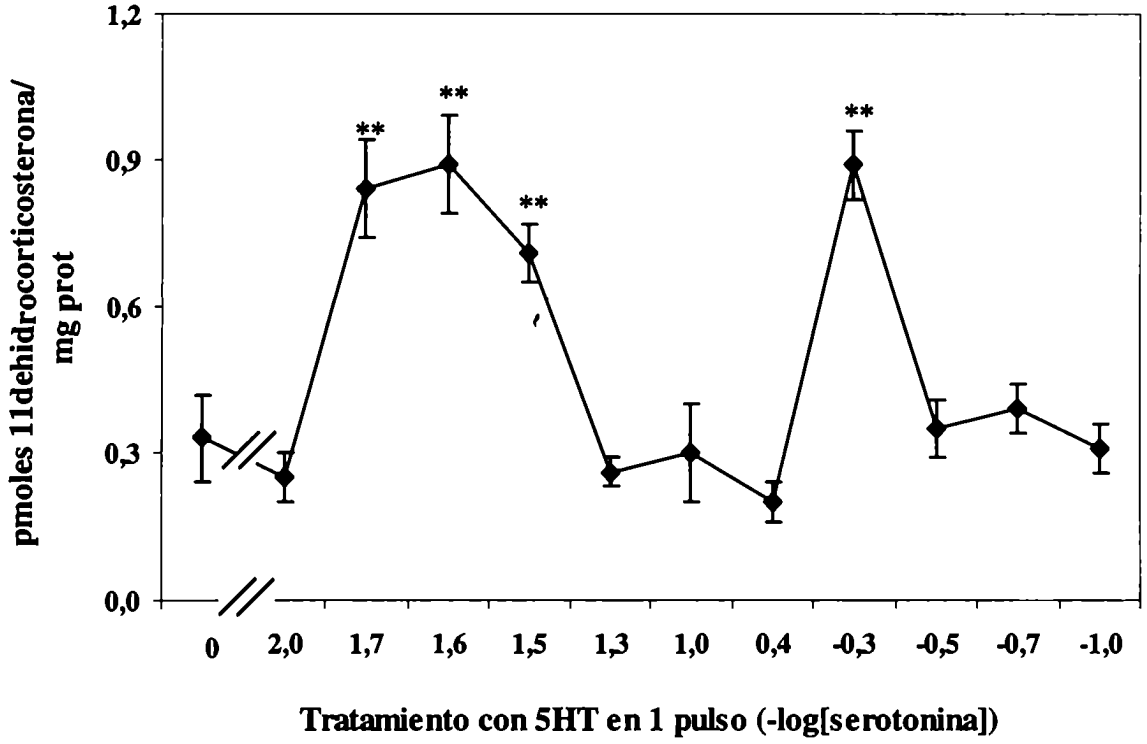


Figura 6.2.6. *Efecto de distintas concentraciones de 5HT agregadas en un único pulso.* Incubación durante 75 min de 4 x 10^6 células con 10 nM de B tritiada sin 5HT y con distintas concentraciones de 5HT (0,1 nM final – 100 nM final) adicionadas en un único pulso al comienzo de la reacción. Los valores representan la Media ± ES de cinco experimentos independientes. **p< 0,01 versus el control, Test de Dunnett.

La Figura 6.2.6., muestra que la administración de un único pulso, que lleva a una concentración final de serotonina de 2 nM (es decir 1/5 de lo que sea administraba en 5 pulsos), produce un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa, mientras que 10 nM de serotonina administrada en un único pulso, presenta valores similares al control.

La realización de la curva con diferentes cantidades de serotonina administradas en un único pulso (Figura 6.2.6.), permitió observar un efecto multifásico de esta bioamina sobre la estimulación de la actividad 11ßHSD, correspondiendo, el segundo máximo de estimulación para la dosis de 25 pM de serotonina. Esta dosis, 100 veces menor, permite llegar a los mismos niveles de estimulación que la dosis de 2 nM de serotonina.

6.2.3. Efecto de serotonina en función de la concentración de sustrato

Como paso final en el estudio de los efectos de serotonina, se decidió establecer el comportamiento de la misma a lo largo de la curva de concentración de sustrato. Para ello se realizaron incubaciones en un rango de concentraciones de corticosterona tritiada que fue de 1 nM a 20 nM, sin serotonina o con dos dosis diferentes, agregadas en 5 pulsos (Figura 6.2.7.) o en un único pulso (Figura 6.2.8.).

En la Figura 6.2.7., se presentan los resultados del agregado pulsátil de serotonina 10 nM y 0,1 nM. Para ambos casos se observa un aumento de la actividad 11ßHSD2 respecto del control, dependiendo de la concentración de sustrato disponible en el sistema de incubación. La dosis de 10 nM, llega a un *plateau* en la estimulación a partir de la concentración de 8 nM de corticosterona (no hubo diferencias significativas entre los niveles de estimulación con 8 nM, 12 nM y 20 nM de corticosterona). Esta saturación no se observa para la menor dosis de serotonina, la cual presenta un máximo de estimulación a la concentración de corticosterona de 20 nM. Hay un desplazamiento de la curva de estimulación hacia la izquierda, cuando disminuye la dosis de serotonina administrada. Posiblemente, para poder llegar a observar el mismo tipo de saturación que en el caso de la concentración de 10 nM de serotonina, habría que estudiar el comportamiento de la dosis de 0,1 nM de serotonina, a mayores concentraciones de sustrato.

Para los ensayos realizados con un único pulso de serotonina (Figuras 6.2.8.), la administración de serotonina 2 nM, mostró un aumento progresivo de la estimulación enzimática a medida que aumentó la concentración de sustrato, llegando a un *plateau* en la estimulación, a partir de la concentración de corticosterona de 12 nM (no hubo diferencias significativas entre la estimulación a 12 nM de corticosterona y 20 nM). La dosis de 10 nM de serotonina, no presentó estimulación respecto del control para las concentraciones de corticosterona utilizadas.

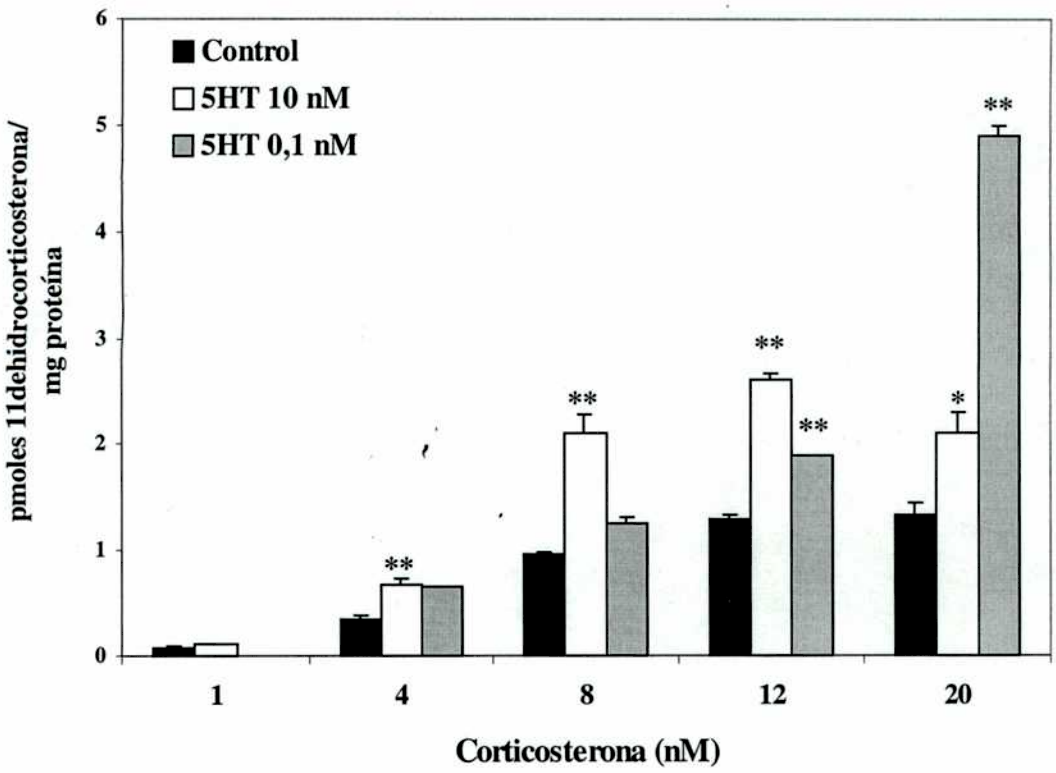


Figura 6.2.7. *Curva de concentración sin y con serotonina agregada en 5 pulsos*. Se incubaron 4 x 10^6 células con distintas cantidades de corticosterona tritiada (1 nM - 20 nM), sin serotonina o con dos concentraciones distintas, 0,1 nM y 10 nM, agregada en 5 pulsos durante los 75 minutos de incubación. Los valores representan la Media $\pm$ ES de tres experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01 versus su respectivo control, Test de Tukey-Kramer.

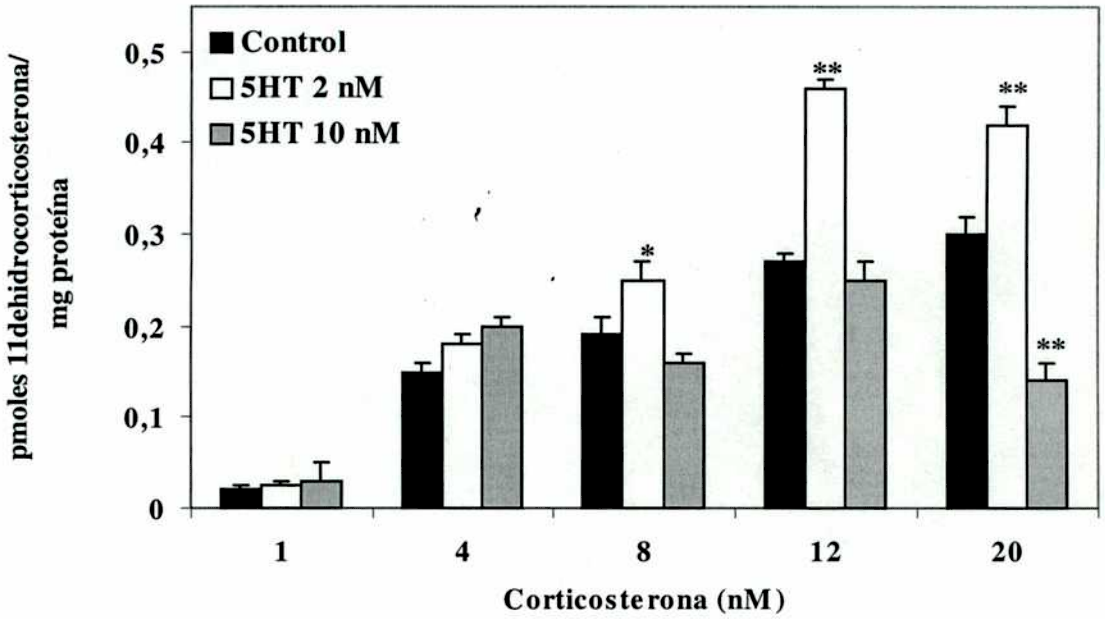


Figura 6.2.8. *Curva de concentración sin y con serotonina agregada en un único pulso.* Se incubaron 4 x 10^6 células con distintas cantidades de corticosterona tritiada (1 nM - 20 nM), sin serotonina o con dos concentraciones distintas, 2 nM y 10 nM, incorporada en un pulso al comienzo de la incubación. Los valores representan la Media ± ES de cuatro experimentos independientes. *$p<0,05$; **$p<0,01$ versus su respectivo control, Test de Tukey-Kramer.

6.2.4. Acción de distintos antagonistas sobre la estimulación de la actividad 11ßHSD mediada por serotonina

Para establecer la especificidad del efecto de serotonina, se realizaron incubaciones con dos antagonistas competitivos de los receptores de serotonina: metiotepina, antagonista de los receptores $5HT_1$ [251;252] y ketanserina antagonista clásico de los receptores $5HT_2$ y, en menor medida, de los receptores $5HT_{1D}$ (*ver Diseño Experimental*) [240;247;251;258;274]. Los resultados se muestran en la Figura 6.2.9.

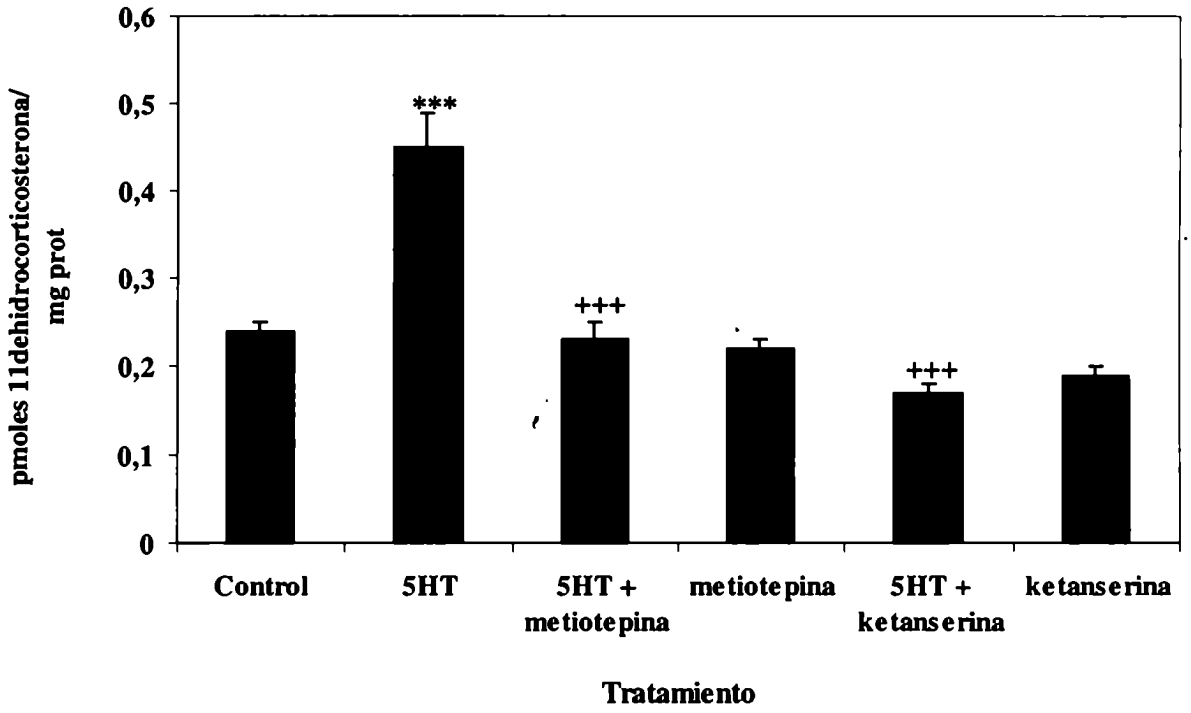


Figura 6.2.9. *Efecto de distintos antagonistas de serotonina.* Se preincubaron las células con metiotepina (antagonista de los receptores $5HT_1$) o ketanserina (antagonista de los receptores $5HT_2$) 1 μM. Después de 15 minutos de preincubación se incorporó la corticosterona tritiada, 10 nM y un único pulso de 1 pmol de serotonina (2 nM final). La incubación se realizó durante 75 minutos. Los valores representan la Media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes. ***p<0,001 versus el control, +++p<0,001 versus 5HT, Test de Tukey-Kramer.

El efecto es específico para serotonina, ya que ambos antagonistas bloquean la estimulación de la actividad 11ßHSD mediada por esta indolamina. Estos resultados concuerdan con los hallados por Schoeffter y Bobirnac [251], quienes estudiaron la inhibición de la acumulación de AMPc en las células MDCK, en presencia de serotonina. Estos autores realizaron una caracterización farmacológica de los receptores para serotonina presentes en la membrana plasmática de las células MDCK, y llegaron a la conclusión de que se trataba del subtipo $5HT_{1D\alpha}$ o de una mezcla $5HT_{1D\alpha}/5HT_{1D\beta}$, en parte debido a la acción antagonista de metiotepina y de ketanserina.

En conclusión, por lo observado en la Figura 6.2.9. y teniendo en cuenta el trabajo de Schoeffter y Bobirnac [251], se puede decir que la estimulación de la actividad 11ßHSD por serotonina estaría mediada por los receptores $5HT_{1D\alpha}$.

6.3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la Sección 4, con el grupo de animales ADX + sonda (Tabla 4.2.2., Figuras 4.2.1., 4.2.2. y 4.2.3.), llevaron a plantear la existencia de algún factor extra-adrenal que estuviera involucrado en la estimulación de la actividad y abundancia de la 11ßHSD2.

Este factor (o factores) debería cumplir con una serie de requisitos: 1) estar involucrado en la respuesta al éstrés por parte del organismo, evidenciando una variación en sus niveles ante una determinada situación de estrés; y 2) estar presente en riñón, ya sea porque es sintetizado por este órgano o porque se acumula en el mismo.

Entre los posibles candidatos se encuentran las catecolaminas (dopamina, epinefrina y norepinefrina) y la serotonina. Todas estas bioaminas han sido detectadas en riñón, ya sea porque son sintetizadas intrarenalmente [104;107;243;244;275-279] o porque son liberadas por las terminaciones nerviosas simpáticas que llegan al riñón [104;107;277;279-281]. En todo caso, se observa una variación en los niveles de estos compuestos ante diversas situaciones de estrés [240;276;278-281].

Nuestros estudios se centraron en los efectos de serotonina sobre la actividad 11ßHSD2 en células provenientes de riñón distal de perro (MDCK). Tomando como punto de partida los trabajos realizados por Seckl y col. [269], quienes detectaron una actividad 11ßHSD2 baja en homogenatos obtenidos a partir de células MDCK en comparación con otras líneas celulares; se realizó una nueva búsqueda para mejorar las condiciones de incubación y determinar, así, actividad de deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (*ver Diseño Experimental*).

Sabiendo que esta enzima posee un valor de K_M dentro del rango nanomolar y, teniendo en cuenta los valores de K_M para corticosterona obtenidos en la Sección 4, se

utilizó un rango de concentraciones de 1 nM a 40 nM, para el cálculo de los parámetros cinéticos (Figura 6.1.1.).

El valor de K_M para corticosterona fue de 12,5 ± 0,8 nM, que coincide con los valores de K_M para la 11ßHSD2, publicados por otros autores [44;135;138;191;193;266;269;273].

Los estudios de inhibición de la actividad enzimática por carbenoxolona, mostraron una disminución de la actividad deshidrogenasa a medida que se aumentó la concentración de inhibidor en el incubado, con una IC_{50} de 0,5 x 10^{-7} M para las células MDCK intactas (Figura 6.1.2.).

Los resultados obtenidos en homogenatos de células (*ver Diseño Experimental*), en donde sólo se detectó actividad 11ßHSD dependiente de NAD^+, con un valor de K_M en el rango nanomolar en células intactas (Figura 6.1.1.), junto con la inhibición por carbenoxolona (Figura 6.1.2.) y la existencia, únicamente, de la isoforma 11ßHSD2 a nivel de riñón distal [25;44;166], si bien son evidencias indirectas, todas ellas sugieren que la actividad 11ßHSD detectada en células MDCK se debe a la enzima 11ßHSD2.

Se observó un efecto estimulatorio de la serotonina (100 μM) sobre la actividad 11ßHSD en células MDCK intactas, a concentraciones saturantes de sustrato, cuando la misma fue agregada en 3, 4 y 6 pulsos (Figura 6.2.1). El hecho que no haya diferencias significativas en la estimulación entre estos tratamientos estaría indicando que se ha llegado a un *plateau*, probablemente debido más a una saturación de la actividad enzimática por la alta concentración de sustrato utilizada (1 μM), que a una saturación de la estimulación en sí misma. Este comportamiento "saturante" estaría ocultando posibles diferencias entre tratamientos. Fue por esta razón, junto con el problema adicional de la obtención de tiempos ceros muy elevados con 1 μM de corticosterona, que se decidió utilizar una concentración de sustrato cercana al valor de K_M calculado que, además, corresponde a valores fisiológicos de glucocorticoides circulantes.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 6.2.1., se realizaron incubaciones de las células MDCK con 100 µM de serotonina agregada en 3 pulsos, pero esta vez con una concentración de corticosterona tritiada de 10 nM (Figura 6.2.2.). Se estudiaron, además, otras dos concentraciones de serotonina, 1 mM y 10 nM.

Los resultados obtenidos en la Figura 6.2.2. mostraron, nuevamente, un aumento significativo de la actividad 11ßHSD cuando se incorporó 100 μM de serotonina, en 3 pulsos, pero esta vez la estimulación fue del 190%. Es decir, que a baja concentración de sustrato, donde la enzima no se encuentra en condiciones saturantes se logra mayor sensibilidad en la respuesta (comparar la Figura 6.2.1. en donde sólo hubo un 80% de estimulación con 100 μM de serotonina, *versus* la Figura 6.2.2. en donde se llegó al 190%)

La administración de 1 mM de serotonina presentó una disminución, aunque no significativa, de la actividad enzimática. Hay que tener en cuenta que esta dosis es 5 órdenes de magnitud más elevada que la que se encuentra en riñón en condiciones normales [244], por lo que este efecto inhibitorio podría deberse más, a una intoxicación de las células que a un efecto sobre la actividad enzimática.

Para el caso de serotonina 10 nM, agregada en 3 pulsos, hubo un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa. Teniendo en cuenta que esta dosis de serotonina corresponde a los niveles detectados en riñón [244], se decidió utilizar esta concentración final, incrementando la frecuencia de los pulsos. Dado que se había observado un leve incremento en la estimulación de la actividad 11ßHSD al aumentar la cantidad de pulsos (Figura 6.2.1.), se realizaron ensayos en presencia de serotonina 10 nM agregada en 5 pulsos. Los resultados mostraron una estimulación cercana al 100% en la actividad enzimática (Figura 6.2.3.). Adicionalmente, se observó un desplazamiento de la curva de estimulación hacia la izquierda cuando se aumentó la cantidad de pulsos en que se adicionó serotonina (Figura 6.2.2. *versus* Figura 6.2.3.). Es decir, habría un aumento de la sensibilidad de la respuesta a bajas dosis cuando se incrementa la frecuencia de incorporación, en donde no sólo sería importante la concentración de serotonina sino también la masa agregada por pulso, que alcanza a cada célula presente en el sistema de incubación.

Se realizaron estudios con diferente cantidad de células para comprobar si al modificarse la masa de serotonina que llegaba a cada una, se obtenían diferencias en la respuesta enzimática. Los resultados presentados en las Figuras 6.2.3. y 6.2.4. evidenciaron similar comportamiento, independientemente de la cantidad de células presente en el incubado, con el máximo de estimulación para la concentración de 10 nM

de serotonina. Es decir, no sería tan importante la masa de serotonina que llega a cada célula, para observar efecto estimulatorio o, tal vez, una reducción a la mitad en la cantidad de células, no fue suficiente como para encontrar diferencias en la activación de la 11ßHSD por serotonina.

Por esta razón, se decidió utilizar una segunda estrategia, en lugar de modificar la cantidad de células se decidió variar la forma de incorporación de serotonina. Ya que 10 nM de serotonina agregada en 5 pulsos, producía una estimulación de la actividad 11ßHSD del 100% (Figura 6.2.3), se estudió el comportamiento de la actividad enzimática agregando 1/5 de la concentración de serotonina original, es decir un único pulso de serotonina que lleva a una concentración final de 2 nM. Para ello, no sólo se analizó la dosis de 2 nM sino que se realizó un estudio del comportamiento enzimático en presencia de otras dosis de serotonina, todas incorporadas en un único pulso, incluyendo la dosis de 10 nM de serotonina (Figura 6.2.6).

Por lo presentado en la Figura 6.2.6., se puede observar que, efectivamente, al disminuir en 1/5 la masa de serotonina que llega a cada célula (2 nM final) se logró obtener estimulación de la actividad enzimática. Sin embargo, esta respuesta fue cuantitativamente mayor que para el caso de 10 nM de serotonina administrada en 5 pulsos (Figuras 6.2.3 y 6.2.4). Cuando se utilizó la concentración de 10 nM de serotonina en un único pulso al comienzo de la reacción, no hubo diferencias significativas de la actividad enzimática respecto del control sin estimular (Figura 6.2.6).

Los resultados de la Figura 6.2.6, ponen en evidencia, primero, que una reducción a la mitad en la masa de serotonina no es suficiente para poder observar modificaciones en la respuesta enzimática (Figuras 6.2.3 y 6.2.4). Es necesario ampliar dicha brecha para poder observar diferencias. Segundo, evidentemente con un único pulso, dependiendo de la dosis, se logra el mismo efecto estimulatorio, cualitativamente hablando, que cuando se administra la serotonina en forma pulsátil. Esto plantea la pregunta de si realmente es necesario que la serotonina se administre en pulsos o si, en realidad, encontrando la dosis óptima, es suficiente para lograr el máximo de estimulación con un único pulso de serotonina. Tercero, existe un incremento en la sensibilidad de la respuesta a dosis menores de serotonina.

La curva de actividad para las diferentes dosis de serotonina, mostró un comportamiento multifásico en la estimulación de la actividad 11ßHSD, obteniéndose un máximo con 2 nM de serotonina y otro con una dosis 100 veces menor (25 pM).

Existe un paralelismo en la estimulación enzimática entre la administración pulsátil y la administración equivalente de un único pulso de serotonina (comparar Figura 6.2.3 *versus* Figura 6.2.6: 10 nM de serotonina agregada en 5 pulsos *versus* 2 nM agregado en 1pulso; 0,1 nM de serotonina adicionada en 5 pulsos *versus* 20 pM adicionado en 1 pulso).

Finalmente, se analizó el efecto estimulatorio de serotonina sobre la actividad 11ßHSD para una curva de concentración de corticosterona. El hecho de observarse cierta dependencia de la concentración de corticosterona utilizada, para obtener mayor o menor sensibilidad en la respuesta mediada por serotonina (comparar Figura 6.2.1 *versus* Figuras 6.2.3 y 6.2.4), planteó la pregunta de cómo se comportaría la actividad enzimática frente a distintas concentraciones de sustrato y con diferentes dosis de serotonina agregadas en un pulso o en 5 pulsos.

La Figura 6.2.7, muestra el efecto de la administración pulsátil a lo largo de una curva de concentración de corticosterona (1 nM – 20 nM). Para el caso del agregado de 10 nM de serotonina en 5 pulsos, hubo un aumento progresivo de la actividad enzimática, que se volvió significativo respecto de los controles, a partir de la concentración de corticosterona 8 nM. No existieron diferencias significativas entre los valores de estimulación con 8 nM, 12 nM y 20 nM de corticosterona, es decir, se llegó a una saturación en la estimulación. Para la dosis de 0,1 nM de serotonina/5 pulsos, también existió un aumento progresivo de la actividad enzimática, volviéndose significativo respecto a los valores del control para la concentración de 12 nM de corticosterona. Es decir, nuevamente se observó un desplazamiento, hacia la izquierda, de la curva estimulatoria, cuando disminuyó la masa de serotonina por pulso (el mismo efecto se observó entre las Figuras 6.2.2 y 6.2.3, cuando se aumentó la cantidad de pulsos en que se agregó una misma concentración final de serotonina).

En el caso de la concentración 0,1 nM de serotonina agregada en 5 pulsos no se observó saturación de la estimulación, muy probablemente debido a que ésta se encontraba más allá de la concentración máxima de corticosterona utilizada en estos

ensayos (20 nM). Se puede decir que hay una mayor sensibilidad en la respuesta para dosis de serotonina menores. Si bien cualitativamente existe estimulación en ambos casos (10 nM/5 pulsos y 0,1 nM/5pulsos), cuantitativamente esa estimulación es mayor para la dosis de 0,1 nM de serotonina/5 pulsos.

La Figura 6.2.8, muestra los resultados obtenidos para la administración de serotonina en un único pulso. La dosis de 2 nM de serotonina (equivalente a 10 nM/5 pulsos de la Figura 6.2.7), mostró un incremento significativo de la actividad 11ßHSD a partir de la concentración de corticosterona 8 nM (igual que la dosis equivalente), presentando una saturación en la estimulación (igual que la dosis equivalente). Es decir que, la dosis de 2 nM/1pulso mostró el mismo tipo de comportamiento que la dosis de serotonina, 10 nM/5 pulsos (Figura 6.2.7).

La utilización de una concentración de 10 nM de serotonina en un único pulso, al comienzo de la reacción, no presentó efecto estimulatorio a ninguna de las concentraciones de corticosterona estudiadas.

La especificidad de la acción de serotonina quedó comprobada por la utilización de antagonistas (Figura 6.2.9). Tanto metiotepina (antagonista de los receptores $5HT_1$ [251,252]) como ketanserina (antagonista de los receptores $5HT_2$ y, en forma menos potente, de los receptores $5HT_{1D\alpha}$ [240,247,251,258,274]), inhibieron la acción estimulatoria de serotonina. Teniendo en cuenta estos resultados, junto con los hallados por Schoeffter y Bobirnac [251], podríamos decir que el incremento de la actividad 11ßHSD mediado por serotonina, ocurriría por la activación de los receptores $5HT_{1D}$, en particular de la subpoblación de receptores $5HT_{1D\alpha}$.

Sabiendo que la principal vía de acción de los cinco miembros de la subfamilia de receptores $5HT_1$ ($5HT_{1A}$, $5HT_{1B}$, $5HT_{1D}$, $5HT_{1E}$ y $5HT_{1F}$), es a través de la inhibición de la síntesis de AMPc, por acople a la adenilato ciclasa a través de la familia de proteínas G sensibles a la toxina Pertussis (G_i/G_o) [240;247;250-252], es de esperar que en la acción mediada por serotonina, sobre las células MDCK, exista inhibición de la producción de AMPc.

Resumiendo, las células MDCK derivadas de riñón distal de perro, presentan actividad 11ßHSD. Todas las evidencias presentadas, si bien son indirectas, llevan a

suponer que esta actividad es debida a la enzima 11ßHSD2 (dependencia de cofactor, K_M en el orden nM, inhibición por carbenoxolona y el origen distal de las células utilizadas). La serotonina ejercería un efecto estimulatorio sobre la actividad 11ßHSD2 a través de receptores específicos del subtipo $5HT_{1D\alpha}$. En dicho efecto sería importante no sólo la cantidad de serotonina presente en el sistema de incubación sino también la forma en que la misma es agregada y la concentración de glucocorticoides activos.

La falta de efecto para las cantidades más altas de serotonina (1 mM/3 pulsos – Figura 6.2.2. –; 100 μM/5 pulsos, 1 μM/5 pulsos y 100 nM/5 pulsos – Figuras 6.2.3. y 6.2.4. –; 10 nM/1 pulso, 5 nM/1 pulso y 4 nM/pulso – Figura 6.2.6.) estaría indicando que, además de ser importante la cantidad de serotonina administrada cada vez, existiría un efecto de posible inactivación (taquifilaxis) de los receptores de serotonina, en donde a altas dosis la célula se vuelve refractaria al efecto de esta bioamina.

Para el caso de las dosis intermedias (440 pM/1 pulso y 50 pM/1 pulso – Figura 6.2.6.), la falta de estimulación observada podría deberse a una relación subóptima entre pulso, masa de serotonina y concentración de sustrato, la cual no llegaría a producir activación enzimática.

Por lo tanto, la actividad de la 11ßHSD2 renal, no sólo se encontraría regulada por glucocorticoides ante una situación de estrés sino que existirían otros factores, algunos sintetizados por el mismo riñón, que intervendrían en esta regulación. Uno de ellos es la serotonina, la cual produciría estimulación de la actividad de la isoforma 2 distal. Este aumento en la actividad cumpliría la función de inactivar el exceso de glucocorticoides que llega al riñón debido a la estimulación del eje HHA, y de esta manera evitaría el posible aumento de la presión arterial.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

La enzima 11ßHSD2 renal cataliza la inactivación de los glucocorticoides activos a 11-cetoderivados inertes, impidiendo que el exceso de glucocorticoides circulantes en comparación con los niveles de aldosterona, se una y active al MR, lo cual llevaría a un aumento en la reabsorción de sodio y al incremento de la presión arterial.

Teniendo en cuenta que el estrés produce, principalmente, activación del eje HHA y del sistema simpato-medular; es de importancia establecer el comportamiento de la 11ßHSD2 frente a estas situaciones. El aumento en la síntesis y secreción de glucocorticoides al torrente sanguíneo, necesarios para que ocurra la adaptación del organismo frente a una situación de estrés, produciría efectos adversos si no existieran mecanismos de control que regulasen las concentraciones locales de glucocorticoides. A nivel renal, uno de estos mecanismos de regulación esta integrado por la 11ßHSD2 y, por eso, se decidió estudiar su modulación ante diferentes situaciones de estrés, por glucocorticoides y por factores renales involucrados en el estrés, como es el caso de la serotonina.

El estrés agudo aplicado sobre animales intactos, produjo un aumento en la actividad y abundancia de la 11ßHSD2. Estos resultados, junto con la confirmación de la activación del eje HHA, sugieren que dicho incremento permitiría que a nivel de riñón distal no se produjese un aumento en la reabsorción de sodio debido al incremento en los niveles de glucocorticoides circulantes.

El estrés agudo aplicado a animales adrenalectomizados mostró, por un lado, la dependencia de la presencia de la glándula adrenal, para que se produzca un aumento en la actividad 11ßHSD2 y, por otro lado, la existencia de respuesta aún en ausencia de la adrenal, evidenciando la acción de otros factores extra-adrenales involucrados en el aumento de actividad.

Así, ante un estrés como el producido por la operación quirúrgica, es necesario la presencia de la glándula adrenal para que se produzca un aumento en la actividad y abundancia de la enzima. Estos efectos podrían estar mediados por el pico de

glucocorticoides plasmáticos. La intervención, directa o indirecta, de los glucocorticoides sobre la modulación de la 11ßHSD2 queda confirmada por los estudios realizados en los animales sometidos a estrés por generación de una acidosis metabólica. Sólo existe recuperación de la actividad cuando los animales ADX acidóticos son, a la vez, inyectados con una dosis fisiológica de corticosterona.

Para el caso de los animales ADX a los que se les introdujo una sonda bucogástrica, el aumento tanto de actividad como de abundancia de la 11ßHSD2 permite establecer la intervención de factores extra-adrenales en la modulación de la respuesta de la enzima frente a una situación de estrés. Esta activación de la 11ßHSD2, a pesar de la ausencia de glucocorticoides circulantes, correspondería a una respuesta condicionada por parte del organismo, frente a dicha situación de estrés.

No hay que dejar de remarcar, el aparente efecto bifásico de los glucocorticoides sobre la abundancia de la isoforma 2, ante una situación de estrés. Niveles subfisiológicos de glucocorticoides o extremadamente elevados, producen un incremento en la abundancia de la enzima. Mientras que niveles intermedios de corticosterona no afectan su abundancia.

El aumento en la expresión por el exceso de glucocorticoides circulantes, así como la disminución en la misma, por los niveles intermedios, es fácil de explicar. En el primer caso, dicho aumento se produce por la necesidad de disminuir la cantidad de glucocorticoides activos a nivel renal distal, en el segundo caso no hay necesidad de un aumento en la expresión ya que no hay aumento en los niveles de glucocorticoides activos.

El aumento de la abundancia cuando los niveles de corticosterona son subfisiológicos o apenas detectables, es un poco más difícil de explicar, salvo que se trate de una respuesta condicionada del organismo producida por el agente estresor.

Para el caso de la administración de distintas dosis de corticosterona a animales ADX en condiciones basales, existe un comportamiento diferencial dependiendo de la forma de administración (aguda o crónica) e independientemente de las concentraciones de glucocorticoides circulantes que se obtienen con cada dosis. Sólo la dosis de corticosterona que permite alcanzar valores fisiológicos de glucocorticoides, es la que

logra un aumento de la actividad y de la abundancia de la isoforma 2. En condiciones basales, es decir ausencia de estrés, niveles bajos de glucocorticoides circulantes no lograrían mantener los valores normales de actividad y abundancia de la 11ßHSD2. Hecho que concuerda, además, con la necesidad de mantener a estos bajos niveles de glucocorticoides, en un estado activo.

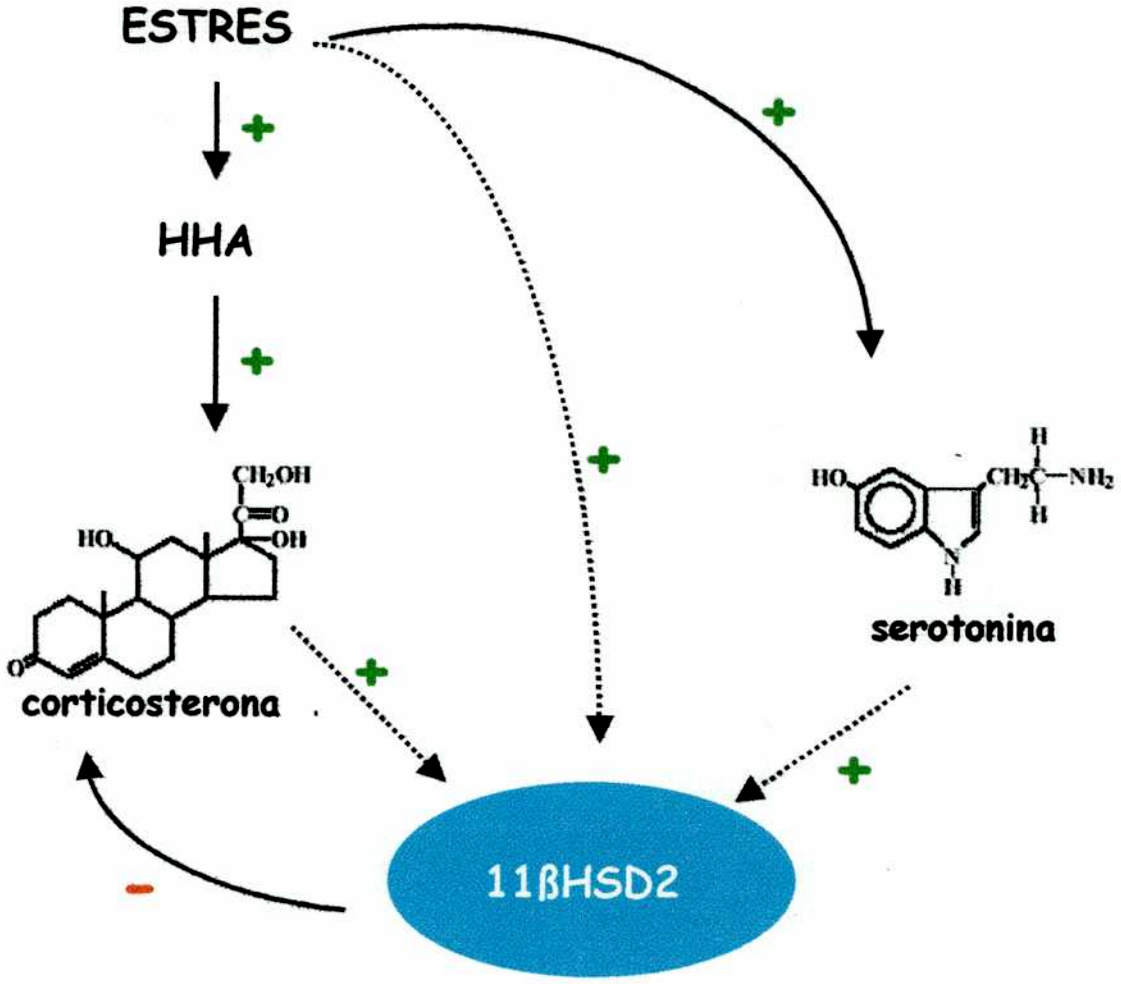
Concentraciones fisiológicas de corticosterona restablecen dichos valores de actividad y abundancia, mientras que un exceso de glucocorticoides en ausencia de estrés, produce disminución de la actividad y abundancia de la 11ßHSD2, presente en riñón distal.

Para las dosis crónicas, existe un efecto "adaptativo" o de "resetting", de la enzima frente a las sucesivas dosis de corticosterona administrada, en donde existe un incremento progresivo de la actividad enzimática a medida que se aumenta la dosis, siendo máximo y significativo para la mayor dosis que corresponde a valores farmacológicos de glucocorticoides circulantes. La abundancia de la 11ßHSD2 también muestra un aumento, significativo en todos los casos. Es decir, que la inyección crónica de corticosterona permite que el organismo se adapte a esta nueva condición y responda, al cabo del tratamiento, con un aumento en la actividad y abundancia de la enzima. De esta forma, a mayor cantidad de glucocorticoides circulantes habría un aumento en la actividad y abundancia de la enzima que se encargaría de la inactivación de los mismos.

Tanto las catecolaminas como la serotonina son sintetizadas por el riñón y sus niveles aumentan ante situaciones de estrés. En el caso de la serotonina, ésta produce estimulación de la actividad de la 11ßHSD2, ayudando a inactivar al exceso de glucocorticoides que llegan al riñón distal y que, en caso contrario, producirían un aumento en la retención de sodio e hipertensión arterial. Estos efectos de serotonina estarían mediados, en parte, por receptores 5HT1 y 5HT2.

El comportamiento de la enzima 11ßHSD2 no sólo dependería de la presencia de la serotonina sino también de su cantidad y forma de secreción, ya que una elevada concentración de serotonina origina un efecto "refractario" sobre la actividad 11ßHSD2, mientras que la misma concentración distribuida en pulsos, produce estimulación de la misma.

A manera de resumen se muestra el siguiente esquema mostrando la regulación de la 11ßHSD2 por los distintos factores involucrados en este estudio.



En la Figura se muestran las vías de regulación de la 11ßHSD2 renal. Las flechas continuas representan mecanismos ya conocidos, los cuales se encuentran respaldados por datos bibliográficos. Las flechas punteadas representan las vías de regulación de la enzima halladas en esta Tesis.

Dependiendo del tipo de estrés aplicado al animal, existe una mayor o menor influencia de la glándula adrenal sobre la 11ßHSD2 renal. Bajo ciertas situaciones de estrés agudo, hay un aumento de la actividad deshidrogenasa dependiente de NAD^+, aún

en ausencia de adrenales; mientras que en otras situaciones estresantes sólo la presencia de niveles fisiológicos de glucocorticóides o de las glándulas adrenales intactas, permiten observar un incremento en dicha actividad.

Los glucocorticoides *per se*, también regulan la actividad de la 11ßHSD2 en condiciones basales. Esta acción sería ejercida, directa o indirectamente, sobre la enzima, siendo el resultado final la modulación de los niveles de glucocorticoides activos que alcanzan al riñón.

Para el caso de serotonina, ésta ejercería su efecto estimulatorio sobre la 11ßHSD2, a través de receptores de membrana $5HT_{1D}$, acoplados a proteínas G sensibles a la toxina Pertussis, con la consecuente disminución en la acumulación intracelular de AMPc. Los resultados obtenidos con serotonina no sólo serían nóveles en cuanto al efecto que tiene está bioamina sobre la 11ßHSD2, sino que sugieren la existencia de un nuevo mecanismo de regulación de la respuesta al estrés, a nivel local; en donde el exceso de glucocorticoides circulantes, debido a la activación del eje HHA, sería inactivado por el aumento de la actividad 11ßHSD2 renal, mediado por serotonina, hecho que ayudaría a la finalización de la respuesta al estrés, cerrando, así, el ciclo propuesto.

Queda abierta la pregunta sobre la existencia de modulación de la 11ßHSD2 por las catecolaminas, las cuales, además de sufrir alteraciones en sus niveles frente a una situación de estrés, también se encuentran presentes en el riñón, por lo que es dable pensar que puedan estar ejerciendo algún tipo de regulación sobre esta enzima.

Referencias

8. REFERENCIAS

1. Shimojo M., Whorwood C., y Stewart P. (1996) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat adrenal. *Journal of Molecular Endocrinology*, **17**, 121-130.

2. Orth D., Kovacs W., y DeBold C. (1992) The adrenal cortex. In Wilson J. and Foster D. (eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, pp 489-605.

3. Pignatelli D., Magalhães M.M., y Magalhães M.C. (1998) Direct effects of stress on adrenocortical function. *Hormonal Metabolic Research*, **30**, 464-474.

4. Ehrhart-Bornstein M., Hinson J., Bornstein S., Scherbaum W., y Vinson G. (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews*, **19**, 101-143.

5. Lantos C. (1997) La evolución de una parte del pensamiento biológico moderno y la revolución silenciosa de la endocrinología básica de fines del milenio. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, **227**, 55-70.

6. Schimmer B. y Parker K. (2003) Adrenocorticotropic Hormone; Adrenocortical Steroids and their Synthetic Analogs; Inhibitors of the Synthesis and Actions of Adrenocortical Hormones. *Goodman & Gilman.*, pp 1649-77.

7. Feige J., Keramidas M., y Chambaz E. (1998) Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. *Hormonal Metabolic Research*, **30**, 421-425.

8. Seckl J (1996) Expression and properties of corticosteroid receptors in the CNS. In Stone T. (ed.) *CNS: Neurotransmitters and Neuromodulators. Neuroactive Steroids*. New York, pp 1-21.

9. Matkovic L. y Cozza E. (1995) Enzimología de la biosíntesis de aldosterona. Una revisión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **29**, 159-165.

10. Matkovic L., Gomez-Sanchez C., Lantos C., y Cozza E. (1998) Alteraciones en la enzimología de la producción de aldosterona. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **32**, 3-12.

11. Borruel,M., Borruel P., Damasco C., y Lantos C. (1974) The *in vitro* investigation of four radioactive corticosteroids in the Antarctic Seal (*Leptonychotes weddellii*). *General and Comparative Endocrinology*, **22**, 1-12.

12. Shepherd S. y Holzwarth M. (2001) Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *American Journal of Physiology.Cell Physiology*, **280**, C61-C71.

13. Zuckerman-Levin N., Tiosano D., Eisenhofer G., Bornstein S., y Hochberg Z. (2001) The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: a study in isolated glucocorticoid deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5920-5924.

14. Mulrow P. (1998) Renin-Angiotensin System in the adrenal. *Hormonal Metabolic Research*, **30**, 346-349.

15. Wurtman R. y Axelrod J. (1966) Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *Journal of Biological Chemistry*, **241**.

16. Wurtman R., Axelrod J., Vesell E., y Ross G. (1968) Species differences in inductibility of phenulethanolamine-N-methyltransferase. *Endocrinology*, **82**.

17. Brudieux R., Chirvan-Nia P., y Delost P. (1966) Sur les relations directes entre la médullo-surrénale et le cortex surrénale. *Journal Physiology (París)*, **58**, 213.

18. Brudieux R. y Delost P. (1967) Secretion des corticosteroides apres destruction de la medulla surrénale. *Journal Physiology (París)*, **59**, 362.

19. Whitcomb R., Linehan W., Wahl L., y Knazek R. (1988) Monocytes stimulate cortisol production by cultured human adrenocortical cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **66**, 33-38.

20. Borruel M., Lantos C., y Poumeau-Delille G. (1968) Action in vitro de l'adrénaline sur la synthese des corticoides chez le rat et la souris. *C.R.Academic of Sciences Paris*, **266**, 2463-2464.

21. Lefebvre H., Compagnon P., Contesse V., Delarue C., Thuillez C., Vaudry H., y Kuhn J. (2001) Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5001-5007.

22. Bornstein S. y Vaudry H. (1998) Paracrine and neuroendocrine regulation of the adrenal gland - basic and clinical aspects. *Hormonal Metabolic Research*, **30**, 292-296.

23. Harris H., Kotelevtsev Y., Mullins J., Seckl J, y Holmes M. (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase (11ß-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11ß-HSD-1-deficient mice. *Endocrinology*, **142**, 114-120.

24. Akana S., Chu A., Soriano L., y Dallman M (2001) Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotropic hormone, insulin and fat depots. *Journal of Neuroendocrinology*, **13**, 625.

25. Stewart P. y Krozowski Z. (1999) 11ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Vitamins and Hormones*, **57**, 249-324.

26. Kovacs K., Foldes A., y Sawchenko P. (2000) Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience*, **20**, 3843-3852.

27. Ma X. y Aguilera G. (1999) Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology*, **140**, 5642-5650.

28. Malendowicz L., Tortorella C., y Nussdorfer G. (1999) Orexins stimulate corticosterone secretion of fat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *Journal Steroid Biochemistry and Mollecular Biology*, **70**, 185-188.

29. Romero D. Regulación de la esteroidogénesis adrenal: efectos de Endotelina y ACTH, y rol de la 11ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa. 1999. Universidad de Buenos Aires. Tesis.

30. Lifton R. (1996) Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, **272**, 676-680.

31. Morel F. y Chabardes D. (1985) Functional Segmentation of the Nephron. In Seldin D. y Giebisch G. (eds.) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, New York, pp 519-29.

32. Devalle J. y Lantos C. (1971) An effect of ACTH on the metabolism of 1,2 ^{3}Hcorticosterone by cell free rat adrenal preparation. *Acta Physiologica Latino Americana*, **21**, 256-259.

33. Lantos C. (1981) Corticosteroids as Hormones and Metabolic Precursors in Normal and Abnormal Tissues. In Fotherby K. y Pal S.B. (eds.) *Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues*. Berlin, pp 131-63.

34. Chawla A., Repa J., Evans R., y Mangelsdorf D. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, **294**, 1866-1870.

35. Odermatt A., Arnold P., y Frey F. (2001) The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 28484-28492.

36. Mangelsdorf D., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., y Evans R. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.

37. Guiochon-Mantel A., Delabre K., Lescop P., y Milgrom E. (1996) The Ernst Shcering Poster Award: Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **56**, 3-9.

38. Ngarmukos C. y Grekin R. (2001) Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *American Journal of Physiology.Endocrinology and Metabolism*, **281**, E1122-E1127.

39. Parker K. y Schimmer B. (1997) Steroidogenic Factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, **18**, 361-376.

40. Beato M. y Klug J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, **6**, 225-236.

41. Pecci A. (1998) Mecanismos de acción celular de los glucocorticoides y de los mineralocorticoides. In McGraw-Hill/Iberoamericana (ed.) *Actualizaciones en Endocrinología*.

42. McKenna N., Lanz R., y O'Malley B. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endorcrine Review*, **20**, 321-344.

43. Bhargava A., Fullerton M., Myles K., Purdy T., Funder J., Pearce D., y Cole T. (2001) The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*, **142**, 1587-1594.

44. Farman N. y Bocchi B. (2000) Mineralocorticoid selectivity: Molecular and cellular aspects. *Kidney International*, **57**, 1364-1369.

45. Diaz R., Brown R., y Seckl J (1998) Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *Journal of Neuroscience*, **18**, 2570-2580.

46. Fauci A. (1979) Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of glucocorticoids. In Baxter J. y Rousseau G. (eds.) *Glucocorticoid Hormone Action.*, pp 449-65.

47. Gelehrter T. (1979) Glucocorticoids and plasma membrane. In Baxter J. y Rousseau G. (eds.) *Glucocorticoid Hormone Action.*, pp 561-74.

48. Qiu J., Wang C., Huang X., y Chen Y. (2003) Nongenomic mechanism of glucocorticoid inhibition of bradykinin-induce calcium influx in PC12 cells: possible involvement of protein kinase C. *Life Science*, **72**, 2533-2542.

49. Vicent G., Pecci A., Ghini A., Piwien-Pilipuk G., y Galigniana M. (2002) Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses. *Experimental Cell Research*, **276**, 142-154.

50. Pecci A., Viegas L., Barañao J., y Beato M. (2001) Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 21062-21069.

51. Lombes M., Binart N., Delahaye F., Baulieu E., y Rafestin-Oblin M. (1994) Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochemical Journal*, **302**, 191-197.

52. Farman N., Oblin M., Lombes M., Delahaye F., Westphal H., Bonvalet J., y Gasc J. (1991) Immunolocalization of gluco and mineralocorticoid receptors in the rabbit kidney. *American Journal of Physiology*, **260**, C226-C233.

53. Gekle M., Freudinger R., Mildenberger S., y Silbernagl S. (2002) Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, **282**, F669-F679.

54. Zhou Z. y Bubien J. (2001) Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *American Journal of Physiology.Cell Physiology*, **281**, C1118-C1130.

55. Alzamora R., Michea L., y Marusic E. (2000) Role of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension*, **35**, 1099-1104.

56. Maguire D., MacNamara B., Cuffe J., Winter D., Doolan C., Urbach V., O'Sullivan G., y Harvey B. (1999) Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids*, **64**, 51-63.

57. Christ M. y Wehling M. (1999) Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids*, **64**, 35-41.

58. Christ M., Douwes K., Eisen C., Bechtner G., Theisen K, y Wehling M. (1995) Rapid effets of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **25**, 117-123.

59. Doolan C. y Harvey B. (1996) Modulation of cytosolic protein kinase C and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 8763-8767.

60. Alzamora R., Marusic E., Gonzalez M., y Michea L. (2003) Nongenomic effect of aldosterone on Na^+,K^+-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology*, **144**, 1266-1272.

61. Köppel H., Christ M., Yard B., Bar P., van der Woude F., y Wehling M. (2003) Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 1297-1302.

62. Gekle M., Freudinger R., Mildenberger S., y Silbernagl S. (2002) Rapid actions of aldosterone on cells from renal epithelium: the possible role of EGF-receptor signaling. *Steroids*, **67**, 499-504.

63. Halm D. (2001) *Rapid actions of steroids*. Focus on "Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone". *American Journal of Physiology.Cell Physiology*, **281**, C1094-C1095.

64. Losel R., Feuring M., Falkenstein E., y Wehling M. (2002) Nongenomic effects of aldosterone: cellular aspects and clinical implications. *Steroids*, **67**, 493-498.

65. Kotelevtsev Y., Holmes M., Burchell A., Houston P., Scholl D., Jamieson P., Best R., Brown R., Edwards C., Seckl J, y Mullins J. (1997) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid inducible responses and resist hyperglycaemia on obesity or stress. *Protocol National Academics of Science USA*, **94**, 14924-14929.

66. Seckl J y Walker B. (2001) Minireview: 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type I - A tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, **142**, 1371-1376.

67. Rask E., Walker B., Söderberg S., Livingstone D., Eliasson M., Johnson O., Andrew R., y Olsson T. (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism obese women: increased adipose 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3330-3336.

68. Gomez-Sanchez C., Gomez-Sanchez E., y Yamakita N. (1995) Endocrine causes of hypertension. *Seminars of Nephrology*, **15**, 106-115.

69. Morton N., Holmes M., Fiévet C., Staels B., Tailleux A., Mullins J., y Seckl J (2001) Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 41293-40300.

70. Igarreta P. Acción de corticoesteroides naturales sobre la secreción de hidrogeniones a nivel renal. 1999. Universidad de Buenos Aires. Tesis

71. White P., Mune T., Rogerson F., Kayes K., y Agarwal A. (1997) Molecular analysis of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Steroids*, **62**, 83-88.

72. Escoubet B., Coureau C., Bonvalet J., y Farman N. (1997) Noncoordinated regulation of epithelial Na channel and Na pump subunit mRNAs in kidney and colon by aldosterone. *American Journal of Physiology*, **272**, V1482-V1491.

73. Djelidi S., Fay M., Cluzeaud F., Escoubet B., Eugene E., Capurro C., Bonvalet J., y Farman N. (1997) Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 32919-32924.

74. Damasco C. y Malnic G. (1987) Effects of corticosteroids on proximal tubular acidification in the rat. *Mineral Electrolyte Metabolism*, **13**, 26-32.

75. Zallocchi,M., Igarreta P., Calvo JC, Reboucas N., y Damasco C. (2003) The mechanisms of brush border Na^+/H^+ exchanger activation by corticosteroids. *Medical Science Monitor*, **9**, BR85-BR90.

76. Bartter F., Delea C., Kawasaki T., y Gill J. (1974) The adrenal cortex and the kidney. *Kidney International*, **6**, 272-280.

77. Mills J. y Thomas S. (1958) The acute effects of cortisone and cortisol upon renal function in man. *Journal of Endocrinology*, **17**, 41-53.

78. Dousa T. y Turner S. (1982) Modulation of the renal brush border transport of phosphate by glucocorticoids and,other factors. *INSERM Symp*, **21**, 377-383.

79. Damasco C., Díaz F., Ceñal J., y Lantos C. (1979) Acute effects of three natural corticosteroids on the acid-base and electrolyte composition of urine in adrenalectomized rats. *Acta Physiological Latinoamerican*, **29**, 305-314.

80. Welbourne T., Phoenix P., Thornley-Brown C., y Welbourne C. (1976) Triamcinolone activation of renal ammonia production. *Protocol Society of Experimental Biological Medicine*, **153**, 539-542.

81. Latif S.,S.M., Ribeiro C., y Morris D. (1997) Selective inhibition of sheep kidney 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase isoform 2 activity by 5alpha-reduced (but not ß) derivatives of adrenocorticosteroids. *Steroids*, **62**, 230-237.

82. Morris D. (1995) The role of steroid metabolism in protective and specificity conferring mechanisms of mineralocorticoid action. *Vitamins and Hormones*, **50**, 461-485.

83. Ferrari P., Bianchetti M., Sansonnens A., y Frey F. (2002) Modulation of renal calcium handling by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Journal American Society of Nephrology*, **13**, 2540-2546.

84. Igarreta P., Lantos C., Calvo J.C., Paladini A., y Damasco C. (1998) Dose-dependence of the effects of corticosterone and the non-glucocorticoid 18-hydroxycorticosterone on the brus border Na^+/H^+ exchanger. *Endocrine Research*, **24**, 601-605.

85. Igarreta P., Calvo J.C., Paladini A., y Damasco C. (1997) Acute effects of two natural corticosteroids on the kinetics of the Na^+/H^+ exchanger in rat renal

brush-border membranes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **75**, 1226-1231.

86. Malnic G., Ansaldo M., Lantos C., y Damasco C. (1997) Regulation of nephron acidification by corticosteroids. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, **30**, 479-486.

87. Damasco C., Ansaldo M., y Malnic G. (1990) Effects of adrenalectomy and acute replacement by corticosteroids on distal acidification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **38**, 720-727.

88. Funder J. (1997) Aldosterone, salt and cardiac fibrosis. *Clinical Experimental Hypertension*, **19**, 885-899.

89. Souness G., Brem A., y Morris D. (2002) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase antisense affects vascular contractile response and glucocorticoid metabolism. *Steroids*, **67**, 195-201.

90. Yau J., Noble J., Kenyon C., Hibberd C., Kotelevtsev Y., Mullins J., y Seckl J (2001) Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Protocol National Academics of Science USA*, **98**, 4716-4721.

91. Yau J. y Seckl J (2001) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type I in the brain; thickening the glucocorticoid soup. *Molecular Psychiatry*, **6**, 611-614.

92. Elenkov I. y Chrousos G. (1999) Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends of Endocrinology and Metabolism*, **10**, 359-368.

93. Elenkov I., Chrousos G., Torpy D., y Chrousos G. (2003) Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Annuals of New York Academics Science*, **876**, 1-13.

94. Shimojo M., Ricketts M., Petrelli M., Moradi P., Johnson G., Bradwell A., Hewison M., Howie A., y Stewart P. (1997) Immunodetection of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in hyman mineralococrticoid target tissues: Evidence for nuclear localization. *Endocrinology*, **138**, 1305-1311.

95. Kenouch S., Lombes M., Delahaye F., Eugene E., Bonvalet J., y Farman N. (1994) Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **79**, 1334-1341.

96. Lombes M., Alfaidy N., Eugene E., Lessana A., Farman N., y Bonvalet J. (1995) Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*, **92**, 175-182.

97. Bonvalet J., Alfaidy N., Farman N., y Lombes M. (1995) Aldosterone: intracellular receptors in human heart. *European Heart Journal*, **16**, 92-97.

98. Reul J., Pearce P., Funder J., y Krozowski Z. (1989) Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: Effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Molecular Endocrinology*, **3**, 1674-1680.

99. Lombes M., Kenouch S., Farman N., Farman N., y Rafestin-Oblin M. (1994) The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, **135**, 834-840.

100. Fagart J., Wurtz J., Souque A., Hellal-Levy C., Moras D., y Rafestin-Oblin M. (1998) Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *The EMBO Journal*, **17**, 3317-3325.

101. Arriza J., Weinberger C., Cerrelli G., Glaser T., Handelin B., Housman D., y Evans R. (1987) Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Fuctional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. *Science*, **237**, 268-275.

102. Bonvalet J. (1998) Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney International (Supplement)*, **65**, 549-556.

103. Eckert R., Randall D., y Augustine G. (1990) El riñón en vertebrados. Osmorregulación y excreción. *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones*, 3ra. edición, Madrid: Editorial Interamericana, pp 387-434.

104. Carneiro J. (1983) Aspectos morfológicos do néfron. In Malnic G. y Marcondes M. (eds.) *Fisiologia Renal*. São Paulo, pp 23-35.

105. Jacobson H. y Kokko J. (1985) Intrarenal Heterogeneity: Vascular and Tubular. In Seldin D. y Giebisch G. (eds.) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, New York, pp 531-80.

106. Maunsbach A. (1966) Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney: Comparison of results from phase contraste, fluorescence and electron microscopy. *Journal of Ultrastrutural Research*, **16**, 239.

107. Kurokawa K. (1985) Cellular Mechanisms and Sites of Hormone Action in the Kidney. In Seldin D. y Giebisch G. (eds.) *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Raven Press, New York, pp 739-74.

108. Walker B. y Edwards C. (1994) Licorice-induce hypertension and syndromes of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **23**, 359-377.

109. Penning T. (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Reviews*, **18**, 281-305.

110. Jamieson P., Chapman K., y Seckl J (1999) Tissue- and temporal-specific regulation of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by glucocorticoids in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **68**, 245-250.

111. Li KXZ., Smith R., Ferrari P., Funder J., y Krozowski Z. (1996) Rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme is expressed at low levels in the placenta and is modulated by adrenal steroids in the kidney. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **120**, 67-75.

112. Low S., Moisan M., Noble J., Edwards C., y Seckl J (1994) Glucocorticoids regulate hippocampal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and gene expression in vivo in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, **6**, 285-290.

113. Walker B, Williams B., y Edwards C. (1994) Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Journal of Endocrinology*, **141**, 467-472.

114. Monder C., Sakai R., Miroff Y., Blanchard D., y Blanchard R. (1994) Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, **134**, 1193-1204.

115. Young J., Moussa L., Dilley R., y Funder J (2003) Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology*, **144**, 1121-1125.

116. Jellinck P., Dhabhar F., Sakai R., y McEwen B. (1997) Long-term corticosteroid treatment but not chronic stress affects 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type I activity in rat brain and peripheral tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **60**, 319-323.

117. Mosso L., Carvajal C., Campino C., Rojas A., Gonzalez A., Barraza A., Montero J., y Fardella C. (2002) [11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in Chilean patients with hypertension]. *Review Med.Chil.*, **130**, 1201-1208.

118. Krozowski Z., Li K., Koyama K., Smith R., Obeyesekere V., Stein-Oakley A., Sasano H., Coulter C., Cole T., y Sheppard K. (1999) The type I and type II 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **69**, 391-401.

119. Lloyd-MacGilp S., Nelson S., Florin M., Lo M., McKinnell J., Sassard J., y Kenyon C. (1999) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid action in lyon hypertensive rats. *Hypertension*, **34**, 1123-1128.

120. Monder C. y Shackleton C. (1984) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? *Steroids*, **44**, 383-417.

121. Lakshmi V y Monder C. (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11ß-hydrogenase component of the rat liver 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*, **123**, 2390-2398.

122. Lakshmi V. y Monder C. (1985) Evidence for independent 11-oxidase and 11-reductase activities of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase: enzyme latency, phase transitions and lipid requirements. *Endocrinology*, **116**, 552-560.

123. Monder C. y Lakshmi V (1989) Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11 beta dehydrogenase in rat liver microsomes. *Journal of Steroid Biochemistry*, **32**, 77-83.

124. Edwards C., Stewart P., Burt D., Brett L., McIntyre M., Sutanto W., de Kloet E., y Monder C. (1988) Localisation of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, **2**, 986-989.

125. Funder J., Pearce P., Smith R., y Smith A. (1988) Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor mediated. *Science*, **242**, 583-585.

126. Sheppard K. y Funder J. (1987) Mineralocorticoid specificity of renal type I receptors: in vivo binding studies. *American Journal of Physiology*, **252**, E224-E229.

127. Náray-Fejes-Tóth A., Rusvai E., y Féjes-Tóth G. (1993) Is the renal type III corticosteroid-binding site the collecting duct-specific isoform of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase? *Endocrinology*, **134**, 1671-1675.

128. Agarwal A., Monder C., Eckstein B., y White P. (1989) Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11ß-dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 18939-18943.

129. Náray-Fejes-Tóth A., Colombowala I., y Fejes-Tóth G. (1998) The role of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in steroid hormone specificity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **65**, 311-316.

130. Brown R., Chapman K., Edwards C., y Seckl J (1993) Human placental 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology*, **132**, 2614-2621.

131. Albiston A., Obeyesekere V., Smith R., y Krozowski Z. (1994) Cloning and tissue distribution of the human 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **105**, R11-R17.

132. Ulick S., Levine L., Gunczler P., Zanconato G., Ramirez L., Rauth W., Rosler A., Bradlow H., and New M. (1979) A syndrome of apparent mineralocorticoid

excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **49**, 757-764.

133. Duax W. and Ghosh D. (1997) Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility and cancer. *Steroids*, **62**, 95-100.

134. Stewart P., Valentino R., Wallace A., Burt D., Shackleton C., and Edwards C. (1987) Mineralocorticoid activity of liquorice: 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet*, **2**, 824.

135. Ferrari P., Smith R., Fundef J., and Krozowski Z. (1996) Substrate and inhibitor specificity of the cloned human 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoform. *American Journal of Physiology*, **270**, E900-E904.

136. Jamieson P., Chapman K., Edwards C., and Seckl J (1995) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11ß-reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, **138**, 4754-4761.

137. Monder C. and White P. (1993) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and Hormones*, **57**, 187-271.

138. Agarwal A., Mune T., Monder C., and White P. (1994) NAD-dependent isoform of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 25959-25962.

139. Stewart P. and Krozowski Z. (1999) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and Hormones*, **57**, 249-324.

140. Oppermann U., Persson B., and Jörnvall (1997) The 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action. *European Journal of Biochemistry*, **249**, 355-360.

141. Brereton P., Driel R., Suhaimi F., Koyama K., Dilley R., and Krozowski Z. (2001) Light and electron microscopy localization of the 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme in the rat. *Endocrinology*, **142**, 1644-1661.

142. Cole T. (1995) Cloning of the mouse 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene: tissue specific expression and localization in distal convoluted tubules adn collecting ducts of the kidney. *Endocrinology*, **136**, 4693-4696.

143. Maser E. (1998) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes. *Cancer Research*, **58**, 2996-3003.

144. Maser E. and Oppermann U. (1997) The 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action: Role of

type-1 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *European Journal of Biochemistry*, **249**, 365-369.

145. Morita H., Cozza E., Zhou M., Gomez-Sanchez E., Romero D., and Gomez-Sanchez C. (1997) Regulation of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat adrenal. Decreased enzymatic activity induced by ACTH. *Endocrine*, **7**, 331-335.

146. Seckl J and Chapman K. (1997) The 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action: Medical and physiological aspects of the 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase system. *European Journal of Biochemistry*, **249**, 361-364.

147. Ricketts M., Verhaeg J., Bujalska I., Howie A., Rainey W., and Stewart P. (1998) Immunohistochemical localization of type 1 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 1325-1335.

148. Monder C., Miroff Y., Marandici A., and Hardy M. (1994) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology*, **134**, 1199-1204.

149. Roland B. and Funder J. (1996) Localization of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: *in situ* studies. *Endocrinology*, **137**, 1123-1128.

150. Rask E., Olsson T., Söderberg S., Andrew R., Livingstone D., Johnson O., and Walker B. (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 1418-1421.

151. Katz J., Mohamed-Ali V., Wood P., Yudkin J., and Coppack S. (1999) An in vivo study of the cortisol-cortisone shuttle in subcutaneous abdominal adipose tissue. *Clinical Endocrinology*, **50**, 63-68.

152. Hatakeyama H., Inaba S., and Miyamori I. (1999) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in culture human vascular cells: possible role in the development of hypertension. *Hypertension*, **33**, 1179-1184.

153. Seckl J (1997) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Fronters of Neuroendocrinology*, **18**, 49-99.

154. Sun K., Yang K., and Challis J. (1997) Differential expresssion of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **82**, 300-305.

155. Korbonits M., Bujalska I., Shimojo M., Nobes J., Jordan S., Grossman A., and Stewart P. (2001) Expression of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: Induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and

other pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 2728-2733.

156. Ferrari P. and Krozowski Z. (2000) Role of the 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney International*, **57**, 1374-1381.

157. Hardy M. and Ganjan V. (1997) Stress, 11ß-HSD, and Leydig cell function. *Journal of Andrology*, **18**, 475-479.

158. Whitworth J., Stewart P., Burt D., Atherden S., and Edwards C. (1989) The kidney is the major site of cortisone production in man. *Clinical Endocrinology*, **31**, 355-361.

159. Walker B., Campbell J., Fraser R., Stewart P., and Edwards C. (1992) Mineralocorticoid excess and inhibition of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clinical Endocrinology*, **27**, 483-492.

160. Holmes M., Kotelevtsev Y., Mullins J., and Seckl J (2001) Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **171**, 15-20.

161. Livingstone D., Jones G., Smith K., Andrew R., Kenyon C., and Walker B. (2000) Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in the obese Zucker rats. *Endocrinology*, **141**, 560-563.

162. Best R., Nelson S., and Walker B. (1997) Dexamethasone and 11-dehydrodexamethasone as tools to investigate the isozymes of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Endocrinology*, **153**, 41-48.

163. Náray-Fejes-Tóth A. and Fejes-Tóth G. (1998) Extranuclear localization of endogenous 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in aldosterone target cells. *Endocrinology*, **139**, 2955-2959.

164. Zhou M., Gomez-Sanchez E., Cox D., Cosby D., and Gomez-Sanchez C. (1995) Cloning, expression, and tissue distribution of the rat nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11ß-hydroxysteroid dehydrogense. *Endocrinology*, **136**, 3729-3734.

165. Smith R.Maguire J., Stein-Oakley A., Sasano H., Takahashi K., Fukushima K., and Krozowski Z. (1996) Localization of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **81**, 3244-3248.

166. Smith R., Li K., Andrew R., and Krozowski Z. (1997) Immunohistochemical and molecular characterization of the rat 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Endocrinology*, **138**, 540-547.

167. Quirk S, Gannell J., and Funder J. (1983) Aldosterone-binding sites in pregnant and lactating rat mammary glands. *Endocrinology*, **113**, 1812-1817.

168. Quirk S., Slattery J., and Funder J. (1990) Epithelial and adipose cells isolated from mammary glands of pregnant and lactating rats differ in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **37**, 529-534.

169. Lai W. (1999) Effects of glycyrrhizin on production of vascular aldosterone and corticosterone. *Hormone Research*, **51**, 182-192.

170. Suzuki T., Sasano H., Suzuki S., Hirasawa G., Takeyama J., Muramatu Y., Date F., Nagura H., and Krozowski Z. (1998) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human lung: possible regulator of mineralocorticoid action. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , **83**, 4022-4025.

171. Hadoke P., Christy C., Kotelevtsev Y., Williams B., Kenyon C., Seckl J, Mullins J., and Walker B. (2001) Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase. *Circulation*, **104**, 2832-2837.

172. Mazzocchi G., Rossi G., Neri G., Malendowicz L., Albertin G., and Nussdorfer G. (1998) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in the human adrenal cortex. *FASEB*, **12**, 1533-1538.

173. Mazzocchi G., Aragona F., Malendowicz L., Gottardo L., and Nussdorfer G. (2001) Cortisol-secreting adrenal adenomas express 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene yet possess low 11beta-HSD2 activity. *Journal of Investigation Medicine*, **49**, 191-194.

174. de Kloet E., Van Acker S., Sibug R., Oitzl M., Meijer O., Rahmouni K., and de Jong W. (2000) Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney International*, **57**, 1329-1336.

175. Darnel A., Archer T., and Yang K. (1999) Regulation of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by steroid hormones and epidermal growth factor in the Ishikawa human endometrial cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **70**, 203-210.

176. Hundertmark S., Buhler H., Fromm M., Kruner-Gareris B., Kruner M., Ragosch V., Kuhlmann K., and Seckl J (2001) Ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: activity in the placenta, kidney, colon of fetal rats and rabbits. *Hormonal Metabolic Research*, **33**, 78-83.

177. Hirasawa G., Takeyama J., Sasano H., Fukushima K., Suzuki T., Muramatu Y., Darnel A., Kaneko C., Hiwatashi N., Toyota T., Nagura H., and Krozowski Z. (2000) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 1306-1309.

178. Morita H., Zhou M., Foecking M., Gomez-Sanchez E., Cozza E., and Gomez-Sanchez C. (1996) 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 complementary deoxyribonucleic acid stably transfected into Chinese Hamster Ovary cells: specific inhibition by 11alpha-hydroxyprogesterone. *Endocrinology*, **137**, 2308-2314.

179. Souness G. and Morris D. (1989) The antinatriuretic and kaliuretic effects of the glucocorticoids corticosterone and cortisol following pretreatment with carbenoxolone sodium (a liquorice derivative) in the adrenalectomized rat. *Endocrinology*, **124**, 1588-1590.

180. Gomez-Sanchez E. and Gomez-Sanchez C. (1992) Central hypertensinogenic effects of glycyrrhizic acid and carbenoxolone. *American Journal of Physiology*, **263**, E1125-E1130.

181. Lindsay R.S., Lindsay R.M., Edwards C., and Seckl J (1996) Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension*, **27**, 1200-1204.

182. Quattropani C., Vogt B., Odermatt A., Dick B., Frey B., and Frey F. (2001) Reduce activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in patients with cholestasis. *Journal of Clinical Investigation*, **108**, 1299-1305.

183. Souness G., Latif S., Laurenzo J., and Morris D. (1995) 11 alpha- and 11 beta-hydroxysteroidprogesterone, 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.

184. Quinkler M., Johanssen S., Grossmann C., Bahr V., Muller M., Oelkers W., and Diederich S. (1999) Progesterone metabolism in the human kidney and inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone and its metabolites. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 4165-4171.

185. Escher G., Meyer K., Vishwanath B., Frey B., and Frey F. (1995) Furosemide inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vitro and in vivo. *Endocrinology*, **136**, 1759-1765.

186. Fuster D., Escher G., Vogt B., Ackermann D., Dick B., Frey B., and Frey F. (1998) Furosemide inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Endocrinology*, **139**, 3849-3854.

187. Alfaidy N., Blot-Chabaud M., Robic D., Kenouch S., Bourbouze R., Bonvalet J., and Farman N. (1995) Characteristics and regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of proximal and distal nephron. *Biochemistry and Biophysical Acta*, **1243**, 461-468.

188. Diederich S., Quinkler M., Miller, K, Heilmann P., Schoneshofer M., and Oelkers W. (1996) Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: regulation by adrenocorticotropin? *European Journal of Endocrinology*, **134**, 301-307.

189. Nolan P., Knepper M., and Packer R. (1997) Inhibition of IMCD 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by low pH and acute acid loading. *Journal American Society of Nephrology*, **8**, 530-534.

190. Alfaidy N., Blot-Chabaud M., Bonvalet J., and Farman N. (1997) Vasopressin potentiates mineralocorticoid selectivity by stimulating 11ß-hydroxysteroid deshydrogenase in rat collecting duct. *Journal of Clinical Investigation*, **100**, 2437-2442.

191. Mantero F., Palermo M., Petrelli M., Tedde R., Stewart P., and Shackleton C. (1996) Apparent mineralocorticoid excess: Type I and type II. *Steroids*, **61**, 193-196.

192. Rosenberg S., Franks R., and Ulick S. (1980) Mineralocorticoid unresponsiveness with severe neonatal hyponatremia and hyperkalemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **50**, 401-404.

193. Ferrari P., Obeyesekere V., Li KXZ., Aragona F., and Krozowski Z. (1996) The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme: biochemical consequences of the congenital R337C mutation. *Steroids*, **61**, 197-200.

194. Stewart P. (1999) Cortisol as a mineralocorticoid in human disease. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **69**, 403-408.

195. Kotelevtsev Y., Brown R., Fleming S., Kenyon C., Edwards C., Seckl J, and Mullins J. (1999) Hypertension in mice lacking 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 683-689.

196. Mantero F., Tedde R., Opocher G., Fulgheri P., Arnaldi G., and Ulick S. (1994) Apparent mineralocorticoid excess type II. *Steroids*, **59**, 80-83.

197. Walker B., Stewart P., Shackleton C., Padfield P., and Edwards C. (1993) Deficient inactivation of cortisol by 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in essential hypertension. *Clinical Endocrinology*, **39**, 221-227.

198. Ferrari P., Lovati E., and Frey F. (2000) The role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Journal of Hypertension*, **18**, 241-248.

199. Torpy D., Mullen N., Ilias I., and Nieman L. (2002) Association of hypertension and hypokalemia with Cushing's syndrome caused by ectopic ACTH secretion: a series of 58 cases. *Annual New York Academic of Science*, **970**, 134-144.

200. Parks L., Turney M., Gaitan D., and Kovacs W. (1998) Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in an ACTH-producing small cell lung cancer. *Journal Steroid Biochemistry and Mollecular Biology*, **67**, 341-346.

201. Koyama K. and Krozowski Z. (2001) Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in Ishikawa cells is associated with changes in cellular proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **183**, 165-170.

202. Koyama K., Myles K., Smith R., and Krozowski Z. (2001) Expression of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in breast tumors and modulation of activity and cell growth in PMC42 cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **76**, 153-159.

203. Krozowski Z. (1994) The Short-chain Alcohol Dehydrogenase superfamily: variations on a common theme. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **51**, 125-130.

204. Gomez-Sanchez E., Ganjan V., Chen Y., Liu Y., Clark S., and Gomez-Sanchez C. (2001) The 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase 2 exists as an inactive dimer. *Steroids*, **66**, 845-848.

205. Pacak K. and Palkovits M. (2001) Stressor specificity of control neuroendocrine responses: implication for stress-related disorders. *Endorcrine Review*, **22**, 502-548.

206. Cannon W. (1939) *The Wisdom of the Body*. W. W. Norton & Co. publishers Inc., New York.

207. van Dijken H., de Goeij D., Sutanto W., Mos J., de Kloet E., and Tilders F. (1993) Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology*, **58**, 57-64.

208. Goldstein D. (1995) *Stress, catecholamines, and cardiovascular disease*.

209. McEwen B. (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine*, **338**, 171-179.

210. Audigé A., Dick B., Frey B., Frey M., Corman B., and Vogt B. (2002) Glucocorticoids and 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene expression in the aging kidney. *European Journal of Clinical Investigation*, **32**, 411-420.

211. Nichols N., Dokas L., Ting S., Kumar S., de Vellis J., Shors T., Uenishi N., Thompson R., and Finch C. (1996) Hippocampal responses to corticosterone and

stress, one of which is the 35,000,M(r) protein, glycerol phosphate dehydrogenase. *Journal of Neuroendocrinology*, **8**, 867-876.

212. Summers C., Summers T., Moore M., Korzan W., Woodley S., Ronan P., Hoglund E., Watt M., and Greenberg N. (2003) Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience*, **116**, 553-563.

213. Plotsky P., Bruhn T., and Vale W. (1985) Hypophysiotrophic regulation of adrenocorticotropin secretion in response to insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology*, **117**, 323-329.

214. Ceccatelli S., Villar M., Goldstein M., and Hökfelt T. (1989) Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Protocol National Academics of Science USA*, **86**, 9569-9573.

215. Herman J. and Cullinan W. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends of Neuroscience*, **20**, 78-84.

216. Pacak K., Palkovits M., Kvetnansky R., Yadid G., Kopin I., and Goldstein D. (1995) Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Annual New York Academic of Science*, **771**, 115-130.

217. Bhatnagar S., Mitchell J., Betito K., Boksa P., and Meaney M. (1995) Effects of chronic intermittent cold stress on pituitary adrenocortical and sympathetic adrenomedullary functioning. *Physiological Behaviour*, **57**, 633-639.

218. Jedema H., Sved A., Zigmond M., and Finlay J. (1999) Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain Research*, **830**, 211-217.

219. Akana S. and Dallman M (1997) Chronic cold in adrenalectomized, corticosterone (B)-treated rats: facilitated corticotropin responses to acute restraint emerge as B increases. *Endocrinology*, **138**, 3249-3258.

220. Dallman M, Akana S., Scribner K., Bradbury M., Walker C., Strack A., and Cascio C. (1992) Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, **4**, 517-526.

221. Besedovsky H., del Rey A., Klusman I., Furukawa H., Monge Arditi G., and Kabiersch A. (1991) Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Journal Steroid Biochemistry and Mollecular Biology*, **40**, 613-618.

222. Baram T., Yi S., Avishai-Eliner S., and Schultz L. (1997) Development neurobiology of the stress response: multilevel regulation of corticotropin-

releasing hormone function. *Annual New York Academic of Science*, **814**, 252-265.

223. Laugero K., Bell M., Bhatnagar S., Soriano L., and Dallman M (2001) Sucrose ingestion normalizes central expression of corticotropin-releasing-factor messenger ribonucleic and energy balance in adrenalectomized rats: a glucocorticoid-metabolic-brain axis? *Endocrinology* , **142**, 2796-2804.

224. Malendowicz L., Nussdorfer G., Markowska A., Tortorella C., and Nowak M. (1995) Investigations on the acute effects of neuropeptides on the pituitary-adrenocortical function in normal and cold-stressed rats. *Experimental Toxicological Pathology*, **47**, 41-45.

225. Bornstein S., Bornstein M., Scherbaum W., Pfeiffer E., and Holst J. (1990) Effects of splachnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*, **127**, 906.

226. Bornstein M., Bornstein S., Guse-Behling H., Stromeyer H., Scherbaum W., Adler G., and et al (1994) Sympatho-adrenal regulation of adrenal androstenedione release. *Neuroendocrinology*, **59**, 406-412.

227. Bornstein M., Bornstein S., Trzeciak W., Usadel H., Guse-Behling H., Waterman M., and et al (1991) Adrenaline stimulates cholesterol SCC cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *Journal of Endocrinology*, **131**, R5-R8.

228. Guse-Behling H., Bornstein M., Bornstein S., Waterman M., Scherbaum W., and Adler G. (1992) Regulation of adrenal steroidogenesis by adrenaline: expression of cytochrome P450 genes. *Journal of Endocrinology*, **135**, 229-237.

229. Grimee R. and Wulfert E. (1995) Acute stress in rats produces a rapid and sustained increase in prostacyclin production in aortic tissue: dependence on corticosterone. *Life Science*, **57**, 69-81.

230. Van Oers J., Hinson J., Binnekade R., and Tilders F. (1992) Physiological role of CRH in the control of ACTH-mediated corticosterone release form the rat adrenal gland. *Endocrinology*, **130**, 282-288.

231. Perraudin L., Delarue C., Lefebvre H., Contesse V., Kuhn J., and Vaudry H. (1993) Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V1 receptors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **76**, 1522-1528.

232. Bornstein M., Bornstein S., and Scherbaum W. (1996) Sympatho-adrenal system and immune system in the regulation of adrenocortical function. *European Journal of Endocrinology*, **135**, 19-26.

233. Yang G., Xi Z., Wan Y., Wang H., and Bi G. (1993) Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biological Signals*, **2**, 166-172.

234. Morrill A., Wolfgang D., Levine M., and Wand G. (1993) Stress alters adenylyl cyclase activity in the pituitary and frontal cortex of the rat. *Life Science*, **53**, 1719-1727.

235. Marti O., Harbuz M., Andres R., Lightman S., and Armario A. (1999) Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. *Brain Research*, **821**, 1-7.

236. Tizabi Y. and Aguilera G. (1992) Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology*, **56**, 611-618.

237. Aguilera G., Kiss A., and Sunar-Akbasak B. (1995) Hyperreninemic hypoaldosteronism after chronic stress in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 1512-1519.

238. Kiss A., Jezova D., and Aguilera G. (1994) Activity of the hypothalamic pituitary adrenal axis and sympathoadrenal system during food and water deprivation in the rat. *Brain Research*, **663**, 84-92.

239. Aguilera G. (1993) Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **45**, 147-151.

240. Sanders-Bush E. and Mayer S. (2003) 5-hydroxytriptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists., pp 269-90.

241. Pivac N., Muck-Seler D., Barisic I., Jakovljevic M., and Puretic Z. (2001) Platelet serotonin concentration in dialysis patients with somatic symptoms of depression. *Life Science*, **68**, 2423-2433.

242. Zółtowski R., Pawlak R., Matys T., Pietraszek M., and Buczko W. (2003) Propanolol modifies platelet serotoninergic mechanisms in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **53**, 265-274.

243. Gross J., Berndt T., and Knox F. (2000) Effect of serotonin receptor antagonist on phosphate excretion. *Journal of the American Society of Nephrology*, **11**, 1002-1007.

244. Berndt T., Liang T., Tyce G., and Knox F. (2001) Intrarenal serotonin, dopamine, and phosphate handling in remmant kidney. *Kidney International*, **59**, 625-630.

245. Wang Y., Berndt T., Gross J., Peterson M., So M., and Knox F. (2001) Effect of inhibition of MAO and COMT on intrarenal dopamine and serotonin and on renal function. *American Journal of Physiology Regulation Integr.Comp.Physiol.*, **280**, R248-R254.

246. Thomas E., Pernar L., Lucki I., and Valentino R. (2003) Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus regulates activity of lateral septal neurons. *Brain Research*, **960**, 201-208.

247. McKittrick C. and McEwen B. (1996) Regulation of serotoninergic function in the CNS by steroid hormones and stress. In Stone T. (ed.) *CNS: Neurotransmitters and Neuromodulators. Neuroactive Steroids*. CRC Press Inc., New York, pp 37-76.

248. de Wardener H. (2001) Hypertension and the hypothalamus. *Physiology Reviews*, **81**, 1600.

249. Bompart G., Copin N., Djouadi F., Bastin J., Ordener C., and Parini A. (2001) Monoamine oxidase in developing rat renal cortex: effect of dexamethasone treatment. *European Journal of Pharmacology*, **415**, 19-26.

250. Laplante P., Diorio J., and Meaney M. (2002) Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. *Brain Research Development Brain Research*, **139**, 199-203.

251. Schoeffter P. and Bobirnac I. (1995) 5-hydroxytryptamine 5HT1D receptors mediating inhibition of cyclic AMP accumulation in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **352**, 256-262.

252. Schoeffter P., Pfeilschifter J., y Bobirnac I. (1995) 5-hydroxytryptamine 5-HT1B receptors inhibiting cyclic AMP accumulation in rat renal messangial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **351**, 35-39.

253. Berg K., Cropper J., Niswender C., Sanders-Bush E., Emeson R., y Clarke W. (2001) RNA-editing of the 5-HT(2C) receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Brain Journal of Pharmacology*, **134**, 386-392.

254. Hapfelmeier G., Haseneder R., Lampadius K., Rammes G., Rupprecht R., y Zieglgänsberger W. (2002) Cloned human and murine serotonin 3A receptors expressed in human embryonic kidney 293 cells display different single-channel kinetics. *Neuroscience Letters*, **335**, 44-48.

255. Miranda F., Alabadí J., Lloréns S., Ruiz de Apodaca R., Centeno J., y Alborch E. (2002) Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *European Journal of Pharmacology*, **439**, 121-127.

256. Contesse V., Reznik Y., Duparc C., Perraudin V., Vaudry H., Kuhn J., y Lefebvre H. (2002) Effects of serotonin and vasopressin on cortisol production

from an adrenocortical tumor causing subclinical Cushing's syndrome. *Endocrine Research*, **28** , 787-791.

257. Cartier D., Lihrmann I., Parmentier F., Bastard C., Bertherat J., Caron P., Kuhn J., Lacroix A., Tabarin A., Young J., Vaudry H., y Lefebvre H. (2003) Overexpression of serotonin 4 receptor in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 248-254.

258. Ramage A. (2001) Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Research Bulletin* , **56**, 425-439.

259. Demchyshyn L., Pristupa Z., Sugamori K., Barker E., Blakely R., Wolfgang W., Forte M., y Niznik H. (1994) Cloning, expression, and localization of a chloride-facilitated, cocaine-sensitive serotonin transporter from *Drosophila melanogaster. Protocol National Academics of Science USA*, **91**, 5158-5162.

260. Chaouloff F (2000) Serotonin, stress and corticoids. *Journal of Psychopharmachology*, **14**, 139-151.

261. Linthorst A., Penalva R., Flachskamm C., Holsboer F., y Reul J. (2002) Forced swim stress activates rat hippocampal serotoninergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing homone receptor-dependent mechanism. *European Journal of Neuroscience*, **16**, 2441-2452.

262. Jorgensen H., Knigge U., Kjaer A., y Warberg J. (1999) Adrenocorticotropic hormone secretion in rats induced by stimulation with serotoninergic compounds. *Journal of Neuroendocrinology*, **11**, 283-290.

263. Tafet G., Toister-Achituv M., y Shinitzky M. (2001) Enhancement of serotonin uptake by cortisol: a possible link between stress and depression. *Cognition Affected Behavour Neuroscience*, **1**, 96-104.

264. Erdeljan P., MacDonald J., y Matthews S. (2001) Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR), not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. *Brain Research*, **896**, 130-136.

265. Damasco C.; y Coronel de Pédazzini M.(1985) Corticosterone secretion by rats after adrenalectomy. *Acta Physiologica Pharmacologica Latino Americana*, **35**, 415-417.

266. Igarreta P., Calvo J.C. y Damasco C. (1999) Activity of renal 11ßhydroxysteroid dehydrogenase 2 (11ßHSD2) in stressed animlas. *Life Sciences*, **64**, 2285-2290.

267. Udelsman R., y Holbrook N. (1994) Endocrine and molecular responses to surgycal stress. *Current Problems on Surgery*, **8**, 653-720.

268.Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Annals of Biochemistry*, **72**, 248-254.

269.Leckie C., Chapman K., Edwards C., y Seckl J. (1995) LLC-PK_1 cells model 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 regulation of glucocorticoid access to renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*, **136**, 5561-5569.

270.Hanwell D., Ishikawa T., Saleki R., y Rotin D. (2002) Trafficking and cell surface stability of the epithelial Na^+ channel expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 977-979.

271.Sasaki M., Suzuki H., Ito K., Abe T., y Sugiyama Y. (2002) Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 6497-6503.

272.Ducoudret O., Barbier O., Tauc M., Fuchs M., y Poujeol P. (2003) Characterization of Zn^{2+} transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochemistry and Biophysical Acta*, **1611**, 171-179.

273.Agarwal A. (2000) Expression of HSD11K (NAD^+ dependent 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase) promoter constructs in renal cell lines. *Endocrine Research*, **26**, 289-302.

274. Arranz B.; Rosel P.; Sarro S.; Ramirez N.; Duenas R.; Cano R.; y Sanchez J. (2003) Altered platelet serotonin 5-HT2A receptor density but not second messenger inositol trisphosphate levels in drug-free schizophrenic patients. *Psychiatry Research*, **118**, 165-174.

275.Del Compare J.; Aguirre J.; Ibarra F.; Barontini M.; y Armando I. (2001) Effects of thyroid hormone on the renal dopaminergic system. *Endocrine*, **15**, 297-303.

276.Carranza A.; Nowicki S.; Barontini M.; y Armando I. (2000) L-Dopa uptake and dopamine production in proximal tubular cells are regulated by beta(2)-adrenergic receptors. *American. Journal of Physiology.Renal Physiology*, **279**, F77-F83.

277.Tanioka H.; Nakamura K.; Fujimura S.; Yoshida M.; Suzuki-Kusaba M.; Hisa H.; y Satoh S. (2002) Facilitatory role of NO in neural norepinephrine release in the rat kidney. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **282**, R1436-R1442.

278.Ye S.; Zhong H.; Duong V.; y Campese V. (2002) Losartan reduces central and peripheral sympathetic nerve activity in a rat model of neurogenic hypertension. *Hypertension*, **39**, 1101-1106.

279.Ye S.; Zhong H.; Yanamadala V.; y Campese V. (2002) Renal injury caused by intrarenal injection of phenol increases afferent and efferent renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Hypertension*, **15**, 717-724.

280.Seals D., y Esler M. (2000) Human ageing and the sympathoadrenal system. *Journal of Physiology*, **529**, 407-417.

281.El Fazaa S., Somody L, Gharbi N., Kamoun A., Gharib C., y Gauquelin-Koch G. (1999) Effects of acute and chronic starvation on central and peripheral noradrenaline turnover, blood pressure and heart rate in the rat. *Experimental Physiology*, **84**, 357-368.

282.Suzuki S.; Koyama K.; Darnel A.; Ishibashi H.; Kobayashi S.; Kubo H.; Suzuki T.; Sasano H.; y Krozowski Z. (2003) Dexamethasone upregulates 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **167**, 1244-1249.

283.Boerner P., Evans-Layng M., Ü H., y Saier M. (1986) Polarity of neutral amino acid transport and characterization of a broad specificity transport activity in a kidney epithelial cell line, MDCK. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 13957-13962.

284.Anderson J., Stevenson B., Jesaitis L., Goodenough D., y Mooseker M. (1988) Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cell Biology*, **106**, 1141-1149.

285.Gstraunthaler G., Pfaller W., y Kotanko P. (1985) Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, **248**, F536-F544.

286.Gaush C., Hard W., y Smith T. (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **122**, 931-935.

287.Cereijido M., Robbins E., Dolan W., Rotunno C., y Sabatini D. (1978) Polarized monolayers formed by epithelial celss on a permeable and translucent support. *Journal of Cell Biology*, **77**, 853-880.

288.Misfeldt D., Hamamoto S., y Pitelka D. (1976) Transepithelial transport in cell culture. *Protocol National Academic of Sciences USA*, **73**, 1212-1216.