

Tesis de Posgrado

Estudios estructurales y bioquímicos sobre C-21 esteroides 18 hidroxilados

Aragones, Alcira

1978

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:

Aragones, Alcira. (1978). Estudios estructurales y bioquímicos sobre C-21 esteroides 18 hidroxilados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1581_Aragones.pdf

Cita tipo Chicago:

Aragones, Alcira. "Estudios estructurales y bioquímicos sobre C-21 esteroides 18 hidroxilados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1581_Aragones.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FCEN-BA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUIMICOS SOBRE
C-21 ESTEROIDES 18 HIDROXILADOS "

Biosíntesis, aislamiento, purificación, propiedades
y estructura de C-21 esteroides 18 hidroxilados

ALCIRA ARAGONES

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

1581

Director de Tesis: Dr. Carlos P. Lantos

Ref. N° 1581
ij.2

1944

A MIS PADRES

A ALICIA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos P. Lantos, quien sugiriera este tema de tesis, por haberme brindado los medios y los consejos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo A. Locascio por su inteligente y eficaz colaboración durante el curso de esta investigación.

Al Dr. Eduardo G. Gros por haber permitido el uso del contador de centelleo líquido y el espectrómetro de masa, así como por su valiosa colaboración en la interpretación de los espectros de masa.

Al Dr. Aldo E.A. Mitta por haber facilitado $^3\text{H}_2\text{O}$.

Al Dr. Jorge Labat por haber gestionado ante Searle la donación de 18 OH Desoxicorticosterona y 18 OH Progesterona.

Al Sr. C. G. Arabehty por la realización de los espectros de masa.

A la Sra. María Elisa Otero de Bedners y al Sr. Francisco Ortega por su colaboración técnica.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, al Instituto Antártico Argentino y a la Comisión Nacional de Energía Atómica, instituciones que mediante subsidios permitieron la ejecución de parte de esta investigación.

ABREVIATURAS Y EQUIVALENCIAS

ACTH:	adenocorticotrofina
AIP:	proteína inducida por aldosterona
ATP:	ácido adenosin trifosfato
B:	corticosterona
BuOH:	butanol
C:	control químico
cpm:	cuentas por minuto
dimetil POPOP:	1-4-bis-2-(4 metil-5feniloxazolil)benceno
DOC:	desoxicorticoesterona
dpm:	desintegraciones por minuto
EtOH:	etanol
ev:	electrón voltios
F:	cortisol
G:	incubados
IR:	infrarrojo
M:	forma más polar de 18 OH B
M+:	ión molecular
m/e:	relación masa carga
MeOH:	metanol
NAD:	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH:	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP:	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
NADPH:	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido
Ø:	control biológico
PG:	propilenglicol
PM:	peso molecular
PPO:	2,5 difeniloxazol
Prog:	progesterona
R _M :	movilidad con respecto a la forma más po- lar de 18 OH B. Esta expresión también es utilizada para designar fracciones radiac- tivas correspondientes a la movilidad in- dicada.

R _M 4.33:	forma menos polar de 18 OH B obtenida en metanol
* R _M 4.33:	forma menos polar de 18 OH B obtenida en ClH 10 ⁻² N
** R _M 4.33:	forma menos polar de 18 OH B obtenida en alcoholes acidificados
rpm:	revoluciones por minuto
RSE:	relación standard externo
THA:	tetrahidroaldosterona
TPG:	tolueno-propilenglicol
um:	unidades de masa
uv:	ultra violeta
18 OH B:	18 hidroxicorticosterona
18 OH DOC:	18 hidroxidesoxicorticosterona
18 OH Prog:	18 hidroxiprogesterona
18 OH 11 dehidro B:	18 hidroxil1dehidrocorticosterona
18 OH 11 dehidro THB:	18 hidroxil1 dehidrotetrahidrocorticosterona
18 OH THA:	18 hidroxitetrahidroaldosterona

INTRODUCCION

1. IMPORTANCIA DE LAS HORMONAS ADRENOCORTICALES

Experimentos con animales demostraron la naturaleza vital de la glándula adrenal, cuando al sacar ambas adrenales (adrenalectomía bilateral) los animales morían en pocos días (1).

En 1927 Rogoff y Stewart (2) extrajeron glándulas adrenales de perro con ClNa 9 % y glicerol y encontraron que el extracto podía ser inyectado intravenosamente con buenos efectos. Sobre un total de 100 perros determinaron el período de supervivencia en perros adrenalectomizados y sin ningún tratamiento, controles.

La mayoría de los animales vivió entre 1 semana y 10 días, el resto poco menos de 1 semana. El mayor período de supervivencia fué de aproximadamente 16 días (1 perro). Entre los 30 perros inyectados con el extracto glandular, 6 sobrevivieron entre 18-78 días y el tiempo de supervivencia del resto fué favorable comparado con los controles.

Tres años después y en forma independiente Swingle y Pfiffner (3) informaron un hecho similar encontrado en gatos adrenalectomizados inyectados con un extracto preparado con corteza de glándulas adrenales bovinas, disectadas libres de tejido graso y medular. El promedio del lapso de vida de 25 gatos adrenalectomizados controles fué 7 días y el rango de 4,5 a 14 días. Los animales tratados con el extracto permanecieron en condiciones normales por 40-80 días. Estos experimentos demostraron que los extractos de la corteza adrenal contienen una o más hormonas, pero no revelaban las acciones fisiológicas que ejercían y que posteriormente se demostró eran de importancia para usos clínicos.

Pfiffner y Vars emprendieron el fraccionamiento de los extractos adrenales juntamente con Wintersteiner (4) y a fines de 1936 Wintersteiner y Pfiffner (5,6) informaron el aislamiento de varios compuestos que, sin embargo resultaron ser inactivos en perros.

Mason, Myers y Kendall (7,8) iniciaron trabajos haciendo uso del ensayo desarrollado por Ingle (9) quien encontró que la administración de extracto corticoadrenal a ratas adrenalectomizadas aumentaba su capacidad de trabajo en proporción a la dosis dada has-

ta que se alcanzaba un nivel máximo.

A fines de 1936 lograron aislar 6 compuestos. Uno sólo de ellos fué activo en ensayos con ratas. Se lo llamó compuesto E de Kendall y luego cortisona.

Ese mismo año Cartland y Kuizenga (10) se interesaron en la preparación de extractos de corteza adrenal con actividad adecuada y pureza suficiente para uso clínico. Los ensayos fueron hechos con el test de supervivencia de ratas. Ingle se unió al grupo en 1941 y desarrolló un nuevo test (11). Se encontró que los extractos adrenales de cerdo eran considerablemente más activos cuando se los ensayaba en ratas o perros, que los extractos de glándula bovina u ovina (12).

En 1943 se habían aislado aproximadamente 28 esteroides de los extractos de corteza adrenal en los laboratorios de Wintersteiner , Kendall y Reichstein. Entre ellos figuraban estrona, Progesterona y Δ 4 androsten 3-17 diona, un número de compuestos con actividad biológica desconocida y seis Δ 4-3 ceto esteroides que rápidamente se vió que tenían algún tipo de actividad específica de la función adrenal.

Otro componente activo, la aldosterona fué aislada en 1953. Esta se distinguía por la presencia de una función oxigenada en C-18, mientras que todos los otros compuestos, activos o inactivos, eran 18 metil esteroides.

2. LA GLANDULA SUPRARRENAL

La glándula suprarrenal es una glándula con funciones que hacen a la defensa del organismo contra agresiones externas y cambios del medio interno.

En los vertebrados superiores se sabe que la suprarrenal posee una parte medular de naturaleza nerviosa de origen embriológico ectodérmico, que segrega catecolaminas y una parte cortical, histológicamente semejante a otras glándulas de secreción de origen mesodérmico, que segrega esteroides.

La corteza suprarrenal consta a su vez de 3 zonas concéntricas cuya denominación responde a características histológicas. Las dos zonas internas, las que se encuentran más cerca de la médula, se denominan zonas fasciculada y reticular. La zona más externa se denomina glomerulosa.

Mientras que la zona glomerulosa y la médula tienen funciones relativamente bien definidas (la glomerulosa segrega hormonas que intervienen en la reabsorción de sodio y agua. La médula segrega hormonas que participan en la respuesta bioenergética al stress), no sucede lo mismo - como se verá más adelante- con la fasciculada y reticular.

3. CORTICOSTEROIDES

El tratamiento del sistema endócrino o cualquier otro aspecto de la fisiología tomada como un todo requiere cierto grado de precaución.

Hay distintos aspectos en los cuales el sistema endócrino puede diferir : a) a través de la evolución filogenética, en distintas clases, órdenes y aún familias de vertebrados b) a través de sucesivas circunstancias de adaptación al medio en un mismo individuo. Por ejemplo; 1) Una misma glándula puede estar presente en todos los vertebrados, pero no necesariamente segregar todas sus hormonas en todas las especies. Esto podría ser el caso de la aldosterona, presente en casi todos los vertebrados, pero que no pudo detectarse en los elasmobranquios. En cambio estos últimos segregan 1-OH corticosterona de la cual los demás carecen.

2) Una hormona puede estar presente en todos los vertebrados pero puede adquirir diferentes propiedades biológicas en distintas especies, como por ejemplo , el cortisol.

3) A través de los vertebrados es evidente el desarrollo de nuevos órganos blanco para una misma hormona (13).

Es decir que es razonable pensar que una hormona y su función están sujetas a cambios en la evolución y cambios circunstanciales de adaptación en un mismo individuo.

3.1 " GLUCOCORTICOIDES " Y " MINERALOCORTICOIDES "

De acuerdo con lo que se dijo en el párrafo anterior, una división de las hormonas de la corteza suprarrenal en dos grandes grupos adolece, evidentemente, del defecto de sobresimplificación.

A los " glucocorticoides" se los asocia-en términos generales-

a) Desde el punto de vista químico a la estructura Δ 4-3 ceto esteroides y a oxhidrilos en C-11 y C-21.

b) Desde el punto de vista anatómico a la limitación de su biosíntesis en la fasciculada y reticular.

c) Desde el punto de vista biológico 1) a una serie de propiedades aparentemente desligadas entre sí sin que se sepa a ciencia cierta, y a esta altura de los conocimientos, si las mismas se hallan ligadas entre sí. Resumiendo, estas propiedades son: a) activación de la gluconeogénesis en hígado (14). b) aumento de glucemia y aumento de depósito de glucógeno en hígado (14,15). c) acciones catabólicas sobre tejido linfático y óseo (14,16,17). d) acciones inmunosupresoras y antiinflamatorias (14,17-19).

2) a la presencia de receptores específicos en una variedad de órganos-blanco tal, que no admite comparación numérica con ningún otro grupo de hormonas. Así, existen receptores a los "glucocorticoides" no sólo en hígado, timo y linfocitos sino que también en huesos, riñón, pulmón, piel y retina (14).

Evidentemente, de acuerdo a lo que se sabe hoy en día sobre mecanismos de acción molecular el punto c1) es parcialmente una consecuencia del punto c2).

Sin embargo este conjunto de funciones biológicas consistentes esencialmente en proveer a los homeotermos de energía y en un papel catabólico no muy bien comprendido parece no ser sino uno de los últimos estados de evolución de los "glucocorticoides". En vertebrados inferiores los "glucocorticoides" - en el caso de hallarse presentes- desempeñan un papel de adaptación al medio hidromineral muy parecida a la función general de los "mineralocorticoides". Y aún en los vertebrados superiores este papel de los " glucocorticoides" coexiste con las otras funciones de estas hormonas.

En los mamíferos, por ejemplo los "glucocorticoides" desempeñan un rol en el funcionamiento renal (20).

Esta relatividad de la función glucocorticoidea se hace extensiva a las zonas de la corteza suprarrenal que producen glucocorticoides.

En efecto, en la fasciculada y reticular se biosintetizan además de éstos, otros compuestos como la 18 OH DOC y - en la rata - la 18 OH B cuyo papel se halla ligado al medio interno.

Finalmente, algunos " glucocorticoides " y otros esteroides, además de tener funciones hormonales poseen propiedades precursoras para mineralocorticoides lo cual será discutido en la parte de biosíntesis de éstos .(veáse fig. 1).

A los " mineralocorticoides " se los asocia con la acción retentora de Na^+ y la retención de Cl^- y H_2O así como la eliminación de K^+ . Estos tres últimos efectos son en parte - aunque no exclusivamente - consecuencia del efecto primario señalado.

En este caso la acción parece bastante mejor definida y estudiada que en el caso de los " glucocorticoides " aunque también hay que hacer varias salvedades al respecto.

a) Desde el punto de vista químico, por otra parte, la estructura de un " mineralocorticoide " no está muy bien definida ya que el carácter se da en compuestos tan distintos entre sí como la aldosterona y la DOC.

Las moléculas de los " mineralocorticoides " carecen de OH en C-11 y si lo poseen deben tener además un CHO en C-18. Las demás condiciones son comunes a los " glucocorticoides ".

b) Desde el punto de vista anatómico la aldosterona es la única hormona estrictamente limitada a la glomerulosa que, sin embargo , también sintetiza corticosterona y otros precursores. La DOC se forma en las tres zonas (21).

c) Desde el punto de vista biológico se entrará a continuación a historiar los descubrimientos que paralelamente llevaron a vincular a los " mineralocorticoides " con el mantenimiento homeostático del medio interno, contituyendo esta serie de eventos uno de los más coherentes de un trabajo experimental endócrino.

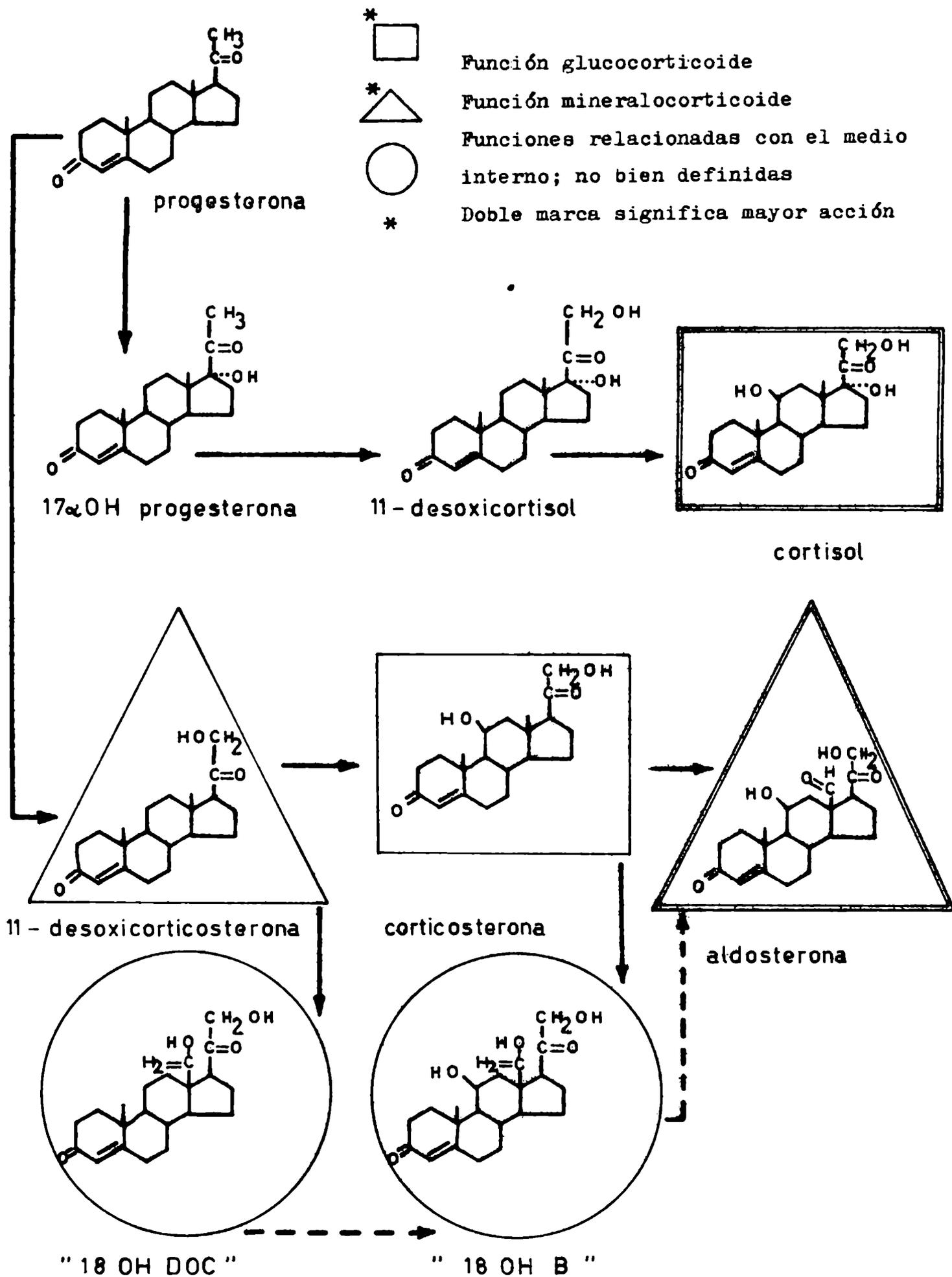


Fig.1: Algunos pasos de la biosíntesis de corticosteroides hormonalmente activos en los cuales se ve que existen compuestos con la doble función de hormonas y precursores de otras hormonas.

En 1926 Lucas (22) descubrió la existencia de una regulación por glándulas esteroideogénicas del transporte iónico al demostrar que la adrenalectomía en el perro producía hipocloremia.

Posteriormente Baumann y Kurland (23) observaron que la adrenalectomía en gatos producía una disminución en el suero de las concentraciones de Cl^- y Na^+ y aumentaba las de K^+ y Mg^{++} .

En 1933 Loeb y col (24) encontraron que perros adrenalectomizados que tenían bajas concentraciones de Cl^- y Na^+ en sangre, eliminaban estos cationes por orina. Los autores señalan la acción de las suprarrenales a nivel del riñón.

Estos estudios fueron confirmados por Harrop y col (25) y Thorn y col (26) quienes demostraron que la inyección de extractos adrenales corregía el defecto en animales adrenalectomizados o con insuficiencia adrenal.

Es precisamente en esa década de los años 30 que se empieza a trabajar intensamente en el aislamiento, cristalización y síntesis de los esteroides activos e inactivos.

De los seis Δ^4 -3 ceto esteroides aislados hasta 1943 en los laboratorios de Wintersteiner, Kendall y Reichstein, uno de ellos la sustancia Q de Reichstein demostró tener una buena acción retentora de Na^+ y sobre la supervivencia de animales adrenalectomizados, sin apreciables efectos sobre otros parámetros que después resultaron ser propios de los glucocorticoides.

Esta sustancia también llamada DOC ó cortexona fué aislada y cristalizada a partir de adrenales de vacuno por Reichstein y von Euw (27), habiendo sin embargo sido sintetizada antes por Steiger y Reichstein en 1937 (28).

La separación y cristalización de 28 esteroides efectuada por los tres grupos de investigadores (pág. 2) produjo como residuo una fracción amorfa que empezó a llamar la atención de Kendall y Wintersteiner por su actividad desproporcionadamente alta en el ensayo de supervivencia. Dicha fracción era más activa - tanto para la retención de Na^+ como para el mantenimiento de la vida - que la DOC. Simpson y Tait (29) obtuvieron evidencias para la existencia de una hormona en dicha fracción amorfa gracias a un ensayo muy sensi-

ble que desarrollaron para medir la actividad mineralocorticoide que consistía en ver un cambio en la relación $\text{Na}^{+23} / \text{K}^{+42}$ urinaria después de administrar el material a animales adrenalectomizados. Mediante varios sistemas cromatográficos se logró aislar 1 mg del material amorfo de muy alta actividad retentora de Na^{+} . Debido a la capacidad de control del balance de electrolitos se la denominó electrocortina (29).

En 1953 dos grupos de investigadores trabajando en forma paralela en Londres (Simpson y Tait) y Reichstein, von Euw y Schindler de la Universidad de Basilea y Wettstein y Neher en los laboratorios Ciba publicaron un trabajo (30) en el cual informan que habían conseguido cristalizar 21,2 mg de electrocortina a partir de 500 Kg de adrenales bovinas.

Muy poco tiempo después Mattox y Mason (31) de la Clínica Mayo aislaron una hormona cristalina de gran actividad mineralocorticoide que fué identificada como la misma hormona aislada por los grupos anteriores.

Simpson y Tait y col (30) dedujeron tentativamente algunos hechos estructurales de esta nueva hormona como la presencia de dos grupos acilables y un grupo $\Delta 4-3$ ceto(fuerte absorción a 238 μ), de una cadena lateral α cetólica (liberación de HCHO por oxidación con BiO₂) y ausencia de $17\alpha\text{OH}$ (reacción de Porter-Silber negativa).

Una vez que se determinó la estructura completa con una función aldehído en C-18 se la denominó aldosterona (32,33).

Los estudios sobre las propiedades biológicas establecieron que la aldosterona era el más potente e importante de los mineralocorticoides(34,35).

Los mecanismos de acción bioquímicos y biofísicos no se pudieron empezar a estudiar bien debido a la dificultad de trabajar con un sistema tan complejo como el riñón de los mamíferos. Estos estudios se hicieron cuando se logró desarrollar preparaciones in vitro con estructura histológica relativamente simple y que respondía de modo predecible y en forma reproducible a la acción de la hormona. Fundamentalmente se usaron la piel ventral de ranas o la vejiga de sapo (35- 37).

En 1951 Using y Zerahn (38) introdujeron un método para medir el transporte activo de iones a través de tejidos aislados. Coincidentemente los estudios de Cartensen y col (39) demostraron que la aldosterona era un producto de secreción normal de las adrenales de rana y Crabbé (35) encontró que al incubar ^{14}C -progesterona con homogenatos de adrenales de sapo (Bufo marinus) y de rana (rana ridibunda) se formaba gran cantidad de aldosterona. Los estudios realizados por varios grupos de investigadores (40-42) pusieron en evidencia el importante papel de la aldosterona en la regulación del balance de electrolitos en anuros. El desarrollo de un sistema in vitro para el estudio de la acción de los mineralocorticoides (35) permitió demostrar que era la aldosterona y no sus metabolitos la responsable del efecto observado.

Así mismo, un hecho importante en el estudio de la aldosterona fue la puesta en evidencia de un período de latencia de alrededor de 1 a 2 horas para provocar su efecto biológico, a pesar de que la vida media de la aldosterona en plasma es de sólo 35 minutos (34,43). Estos y otros estudios (36) permitieron afirmar que 1) la aldosterona actúa por su presencia y no se transforma. 2) su acción es la de " disparar " un proceso que determina el transporte. 3) se trataría de una acción mediata, donde la aldosterona induciría durante el tiempo de latencia la formación de intermediarios activos en el transporte iónico. 4) tal inducción, comenzaría por la unión de la aldosterona a receptores específicos de la membrana, lo que da a ésta su carácter de órgano-blanco o efector. Una vez unidos, comienza la formación del intermediario o intermediarios.

En 1965 se demostró el fenómeno de la inducción por esteroides de la síntesis de RNA y proteínas (44) , que ya había sido sugerido por Edelman y col (45) y Williamson (46).

Posteriormente Fanestil y Edelman (47) , utilizando inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, demostraron que la aldosterona regula el transporte de Na^+ por inducción de la síntesis de proteínas a nivel de la transcripción del DNA.

De los estudios realizados por varios grupos de investigadores (48-51) surgió un posible modelo para el sistema de transporte de Na^+

transepitelial. El modelo incluía la inducción de una proteína-AIP- y admitía que la aldosterona podría actuar de 4 modos:

- 1) aumentando la permeabilidad de la barrera mucosa (de difusión pasiva) al Na^+
- 2) aumentando la actividad de la bomba, incrementando la síntesis de la ATPasa o bien activándola.
- 3) disminuyendo la retrodifusión de Na^+
- 4) aumentando la velocidad de síntesis de ATP y luego su disponibilidad local.

El análisis de estas posibilidades, llevado a cabo por diferentes investigadores, demostró que la retrodifusión no intervenía. Estudios con radioisótopos permitieron afirmar que el aumento de permeabilidad de la barrera mucosa no es probable. Así mismo, los efectos de la aldosterona sobre membranas con potenciales aplicados tales como para mantener constante y fuerte el flujo demostraron que el aumento relativo de flujo neto de Na^+ producido por la aldosterona era igual que bajo condiciones de cortocircuito.

Por lo tanto la aldosterona actuaría más bien sobre la bomba de salida y no facilitando la entrada de Na^+ a la célula.

Esto sugiere que la acción de la aldosterona sobre la bomba podría ser por influencia directa de la AIP sobre los sistemas enzimáticos (la AIP podría ser un componente de la bomba) o que la AIP favorecería la formación de un intermediario de alta energía.

El componente principal de la bomba es probablemente la ATPasa descrita por Skou (50,52). Sin embargo la aldosterona no aumenta el contenido o actividad de la misma en la vejiga de sapo o riñón de rata adrenalectomizada (53,54). Hay evidencias, en cambio , de que la AIP aumenta el suministro de compuestos de alta energía a la bomba, probablemente ATP.

3.2 C-21 ESTEROIDES 18 HIDROXILADOS

Este tercer grupo de corticoides es el más relacionado a la presente tesis. Debido a algunas correlaciones entre estructura, propiedades biosintéticas y lo poco que se sabe de sus propiedades biológicas - correlaciones que sólo se podrán apreciar después del capítulo siguiente- se hablará de los mencionados compuestos al final de la introducción.

4. CAMINOS DE BIOSÍNTESIS

La biosíntesis del colesterol - y a partir de éste, de la de la pregnenolona y de la progesterona - son comunes a los esteroides de la suprarrenal, el testículo y el ovario. En la placenta no se sintetiza colesterol y la escisión de la cadena lateral no es cuantitativamente importante. Las glándulas de secreción interna que sintetizan colesterol suelen utilizar el circulante proveniente de otras fuentes, como por ejemplo el hígado y otros tejidos para biosintetizar sus propias hormonas esteroideas.

4.1 BIOSÍNTESIS DE PREGNENOLONA

La ruptura de la cadena lateral del colesterol es una de las reacciones clave en la biosíntesis de las hormonas esteroides en los órganos endócrinos (fig 2) .

Este sistema enzimático complejo ha sido estudiado con algún detalle en preparaciones de tejido de varios órganos productores de esteroides (55-62) .

La escisión de la cadena lateral se realiza previa hidroxilación del colesterol en las posiciones 20 y 22. El primer intermediario es el 20 hidroxicolesterol. Este compuesto fué obtenido en incubaciones a partir de colesterolradioactivo con suprarrenales por Solomon (63) , con testículos de rata (61) , y cuerpo lúteo(59) . Posteriormente Shimizu y col (64) establecieron el papel del 20 hidroxicolesterol como intermediario del 20-22 dihidroxicolesterol incubando el primero con homogenatos de suprarrenal.

Otros grupos de investigadores (59,65-66) trabajando con tejido adrenal y cuerpo lúteo pudieron aislar también el dihidroxiderivado.

El complejo enzimático necesario para la ruptura de la cadena lateral del colesterol presenta poca especificidad de sustrato como ha sido demostrado por Dorfman (67), Constantopoulos (68) y Chaudhuri y col (69) .

Las preparaciones enzimáticas solubles extraídas a partir de pol-

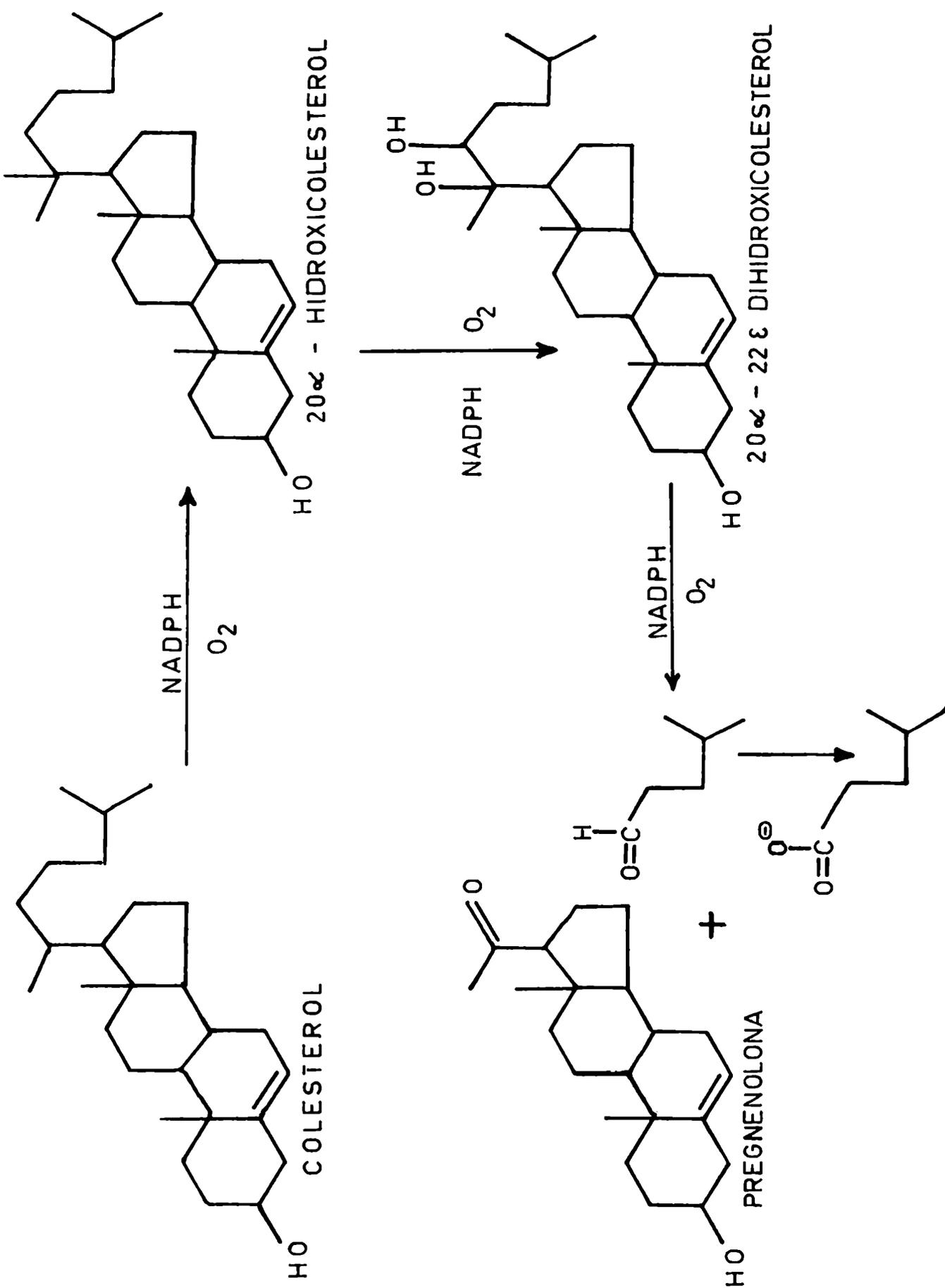


Fig.2: Biosíntesis de Pregnenolona a partir de colesterol.

vos acetónicos de adrenales utilizan como cofactores NADPH ó NADH, éste último es un artificio y no tiene significado fisiológico. Esto ha sido comprobado por Constantinopoulos y col (68) quienes encontraron que el NADH es inactivo en mitocondrias intactas. Además Satoh y col (70) vieron que la concentración de NADH requerida era mucho mayor que la concentración de NADH medida in situ (71- 72).

Por el contrario la concentración óptima de NADPH (73) corresponde a la estimada in situ (71-72).

Satoh (70) demostró además que las preparaciones enzimáticas solubles, a diferencia de las mitocondrias intactas, requerían $PO_4^{=}$ ó $AsO_4^{=}$.

Desde el punto de vista regulatorio el paso que implica la 20 hidroxilación del colesterol es inhibido por pregnenolona, mientras que los factores que causan " swelling " mitocondrial o aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales lo activan. Estudios realizados por varios grupos de investigadores (64,74-76) demostraron el efecto del ACTH en la estimulación de la biosíntesis de glucocorticoides in vitro .

4.2 BIOSÍNTESIS DE PROGESTERONA

La conversión de colesterol en progesterona o su precursor, pregnenolona, fué demostrada en una serie de preparaciones adrenales (77-79).

Bloch (80) estudió la posible conversión de colesterol en el principal metabolito de la progesterona, el pregnanediol.

Cuando inyectaba el colesterol deuterado observó que el 70 % del isótopo se encontraba en el pregnanediol excretado indicando que éste compuesto se formaba exclusivamente a partir del colesterol. En todas las glándulas esteroideogénicas se halla presente un sistema enzimático complejo que comprende una enzima oxidante del OH en C-3 de la pregnenolona y otra isomerizante del doble enlace entre 5 y 6 hacia un doble enlace entre 4 y 5 (fig. 3).

En la glándula adrenal este sistema enzimático se encuentra en la

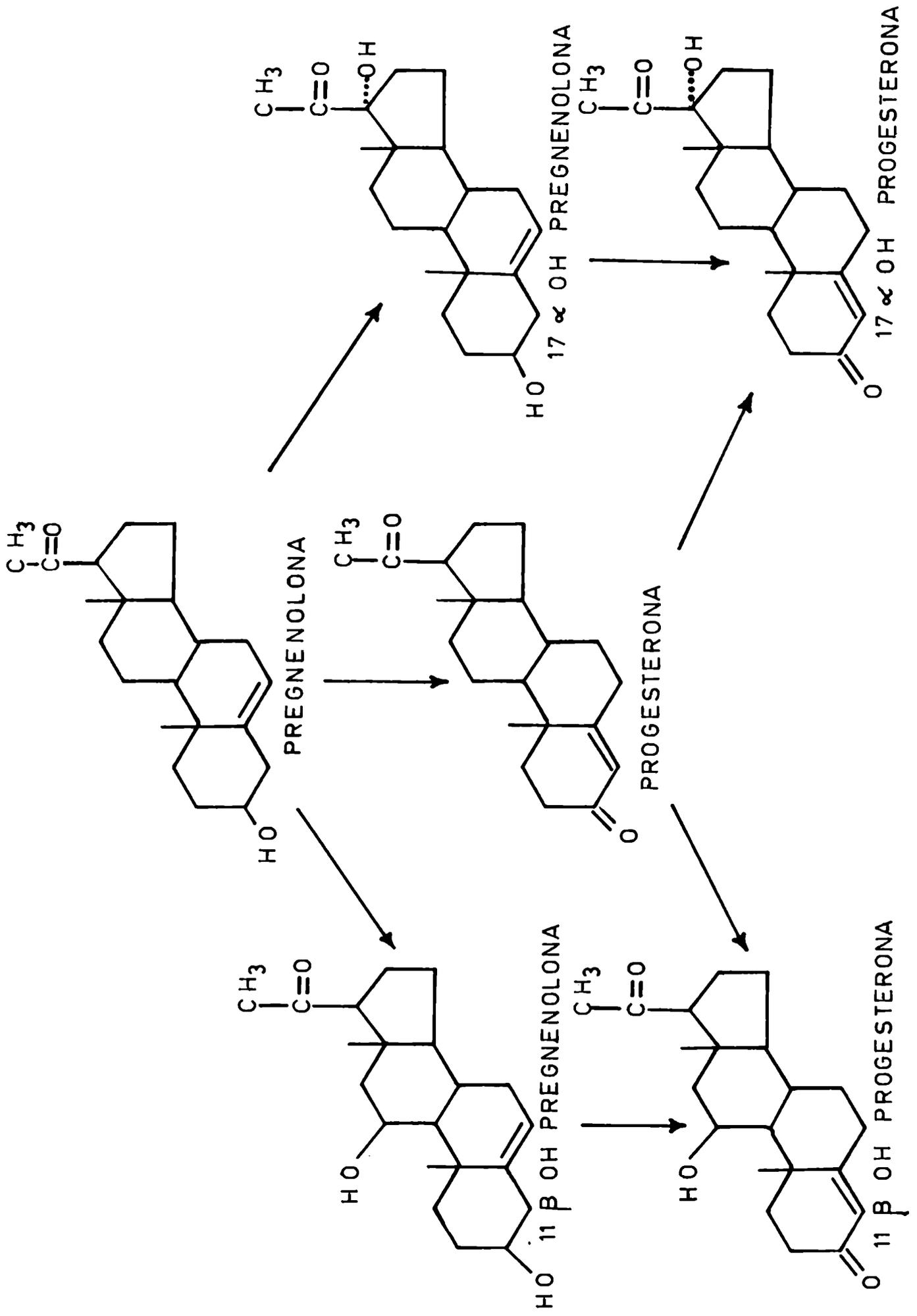


Fig. 3 : Biosíntesis de progesterona y sus 11β y 17α derivados a partir de pregnenolona.

fracción microsomal y requiere como cofactor NAD (81). La utilización de este mediador de hidrógenos constituye uno de los pocos casos de esta índole en esteroidogénesis.

Por su parte Shikita y col (82) demostraron la presencia de 3β ol dehidrogenasa en microsomas de testículos.

Estas enzimas no presentan gran especificidad de sustrato, transformando diferentes precursores en los 3 ceto esteroides correspondientes.

Este hecho da lugar a la gran cantidad de caminos alternativos de biosíntesis de hormonas esteroides a partir de la pregnenolona. En todas las glándulas coexisten varios de estos posibles caminos. La 3β ol dehidrogenasa es de gran importancia desde el punto de vista del desarrollo reproductivo (83).

Su aparición en las células secretoras del testículo (células de Leydig) es temprana y coincide con la diferenciación del pene en el embrión macho. A diferencia, en la suprarrenal aparece a una edad relativamente tardía que coincide aproximadamente con la diferenciación de clítoris y vagina en el embrión hembra y en el ovario, por lo menos de la rata, recién a los nueve días de vida libre.

Además el desarrollo de genitales secundarios en el macho parece depender de la actividad de 3β ol dehidrogenasa en testículo, mientras que no ocurre lo mismo en cuanto a la dependencia de la diferenciación de genitales secundarios femeninos de esta actividad enzimática en suprarrenales u ovario.

En estudios realizados por Potts y col (84) se observó que la utilización de un esteroide sintético (2α ciano-4,4,17 α trimetil androst-5 en-17 β ol-3 ona) que difiere del sustrato original de la enzima, por la sustitución de un grupo ciano nucleofílico en la posición 2α , provocaba hiperplasia adrenal por bloqueo de la biosíntesis de glucocorticoides.

Posteriormente Goldman y col (85) empleando el mismo esteroide sintético demostraron hiperplasia del cuerpo lúteo e inhibición in vivo e in vitro de la actividad de esta 3β enzima en este tejido esteroigogénico mientras que no existían variaciones apreciables

en las 17β ó 3α hidroxisteroides dehidrogenasas.

4.3 BIOSINTESIS DE CORTICOESTEROIDES

La cantidad teórica de caminos biosintéticos de la pregnenolona hasta los dos corticoesteroides más oxidados, cortisol y aldosterona, es en principio muy grande.

En los últimos tres decenios gran parte de la actividad de los investigadores en este campo se ha invertido en el estudio de las aplicabilidades de estos caminos.

Esta actividad pudo tomar un ritmo acelerado a partir de la década del 50 con el empleo de precursores radiactivos, tanto únicos como en pares de dos sustratos marcados con ^3H y ^{14}C respectivamente. Quizás la consecuencia más importante de estos estudios fuera, no tanto la viabilidad, sino la imposibilidad de algunos de estos caminos biosintéticos en diferentes condiciones y especies, cuya elucidación definitiva pudo finalmente llevar a cuadros metabólicos razonablemente fidedignos.

4.3.1 VIA PREGNENOLONA-PROGESTERONA Y VIA DE LOS COMPUESTOS 17 HIDROXILADOS

Estos caminos que se esquematizan en la fig. 4 son los predominantes en gran cantidad de vertebrados.

La ausencia de flechas horizontales que desde la 11 desoxicorticosterona y corticosterona llevan a la serie de los 17 hidroxilados implica que el entrecruzamiento de las dos vías a estos niveles no es posible, probablemente por impedimentos estéricos.

Por otra parte, mientras que el camino pregnenolona-progesterona puede considerarse universal en todos los animales que sintetizan corticoides, no ocurre lo mismo con el de los 17 hidroxilados que falta en la mayoría de los vertebrados de sangre fría, en aves y aún en algunos mamíferos. En todas estas especies el glucocorticoide principal no es el cortisol sino la corticosterona, menos potente que aquél pero también menos especializado, ya que ésta al mismo

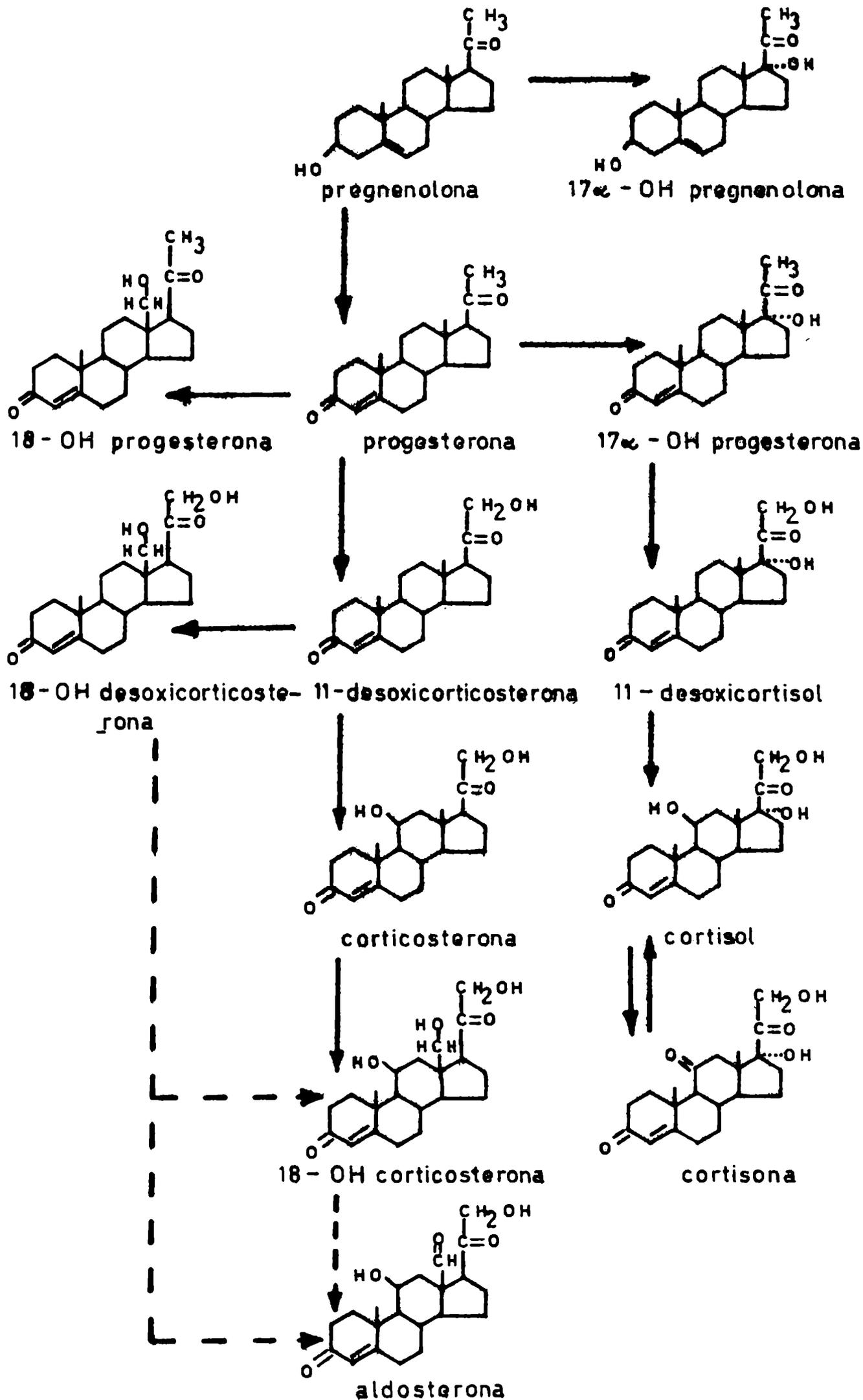


Fig.4 : Biosíntesis de corticoesteroides.

tiempo hace las veces de precursor del principal mineralocorticoide, la aldosterona (fig. 1). En aquellas especies poiquilótermas (elasmobranquios, anfibios y reptiles) cuyas adrenales no poseen 17 hidroxilasa y por ende carecen de un glucocorticoide potente, la razón de tal ausencia probablemente resida en la falta de necesidad de mantener temperaturas corpóreas relativamente elevadas. Sin embargo, en las aves y la mayoría de los roedores (los del grupo rata y los del grupo ratón evolutivamente relacionados al primero) la ausencia de 17 hidroxilasa suprarrenal no es fácil de explicar. Tampoco se entiende muy bien por qué, en cambio, los peces teleósteos producen cortisol aunque algunos endocrinólogos (86) sostienen que en estos poiquilótermos el esteroide desempeña funciones de regulación del equilibrio osmótico, más que de regulación de necesidades energéticas.

La vía esquematizada en la fig. 4 comprende además del sistema enzimático involucrado en el pasaje de pregnenolona a progesterona ya descrito, la participación de hidroxilasas que catalizan la hidroxilación en diferentes posiciones de la molécula del esteroide.

4.3.2 SISTEMA 21 HIDROXILASA

La presencia de un sistema 21 hidroxilasa fué demostrada entre otros por Levy y col (87) quienes extirparon y perfundieron glándulas adrenales bovinas observando que al agregar en el líquido de perfusión progesterona ó 17 OH progesterona obtenían los 11 β 21 dihidroxiesteroides correspondientes.

Por otra parte Hayano y Dorfman (88) obtuvieron resultados similares trabajando con homogenato total de glándula suplementado con fumarato y ATP.

Plager y Samuels (89,90) lograron separar la 21 hidroxilasa de la 11 hidroxilasa ya que observaron que cuando incubaban progesterona con la fracción sobrenadante de 20.000 g proveniente de un homogenato de adrenales vacunas en presencia de NAD y ATP obtenían como producto principal 11 desoxicorticosterona y en mucha menor

Proporción 11 desoxicortisol.

Ryan y Engel (91,92) determinaron la localización de la 21 hidroxilasa en microsomas de adrenales y los requerimientos de NADPH y oxígeno molecular en la reacción catalizada por dicha enzima.

Este tipo de requerimientos permite incluir a la 21 hidroxilasa en la clasificación de oxidasas de función múltiple (93). Los mismos autores demostraron que la 21 hidroxilación era inhibida por CO y que ésta inhibición era revertida por acción de la luz.

La participación de citocromo oxidasa en este sistema fué descartada debido a la ausencia de inhibición por cianuro.

Las diferencias espectrofotométricas observadas con esas preparaciones permitieron demostrar la presencia de un pigmento que al unirse al CO se inactivaba. Un hecho similar ya había sido descrito en microsomas de hígado (95,96).

Es bien sabido que este sistema del cual se hablará más adelante, se denominó citocromo P 450 (97,98).

Estabrook y col (221) y Cooper y col (113) entre otros demostraron el papel del citocromo P 450 en una serie de hidroxilaciones microsomales.

Narasimhulu y col (94) encontraron que el agregado de Triton X-100 a preparaciones de microsomas adrenocorticales mantenía la actividad de 21 hidroxilasa.

4.3.3. SISTEMA 11 HIDROXILASA

La influencia de los sustratos mitocondriales sobre la 11β hidroxilación ha sido de interés desde 1951, cuando un grupo de investigadores (99-101) demostraron que la 11β hidroxilasa de adrenales vacunas estaba asociada con la fracción particulada de la corteza adrenal.

Kahnt y Wettstein (102) y Hayano y Dorfman (101) trabajando con homogenatos emplearon fumarato en presencia de otros cofactores (ATP, NAD y Mg^{++}) para llevar a cabo la 11β hidroxilación de desoxicorticosterona.

Brownie y Grant (103) utilizando una preparación de mitocondrias

de corteza adrenal de buey demostraron que la hidroxilación tenía lugar en presencia de otros sustratos del ciclo de los ácidos tricarbónicos tales como α -ceto glutarato, succinato y malato y observaron un mayor consumo de oxígeno durante la hidroxilación.

La inhibición por dinitrofenol encontrada por los mismos autores implica una dependencia con la fosforilación oxidativa.

Brownie y col (103) demostraron una estimulación de la oxidación de succinato por desoxicorticosterona, pero el incremento en la velocidad de respiración fué mayor que el requerido para dar cuenta de la velocidad de 11β hidroxilación.

Los primeros estudios sobre la 11β hidroxilación por mitocondrias de adrenales referidos a los requerimientos de NAD^+ ó $NADP^+$ sugieren que el mecanismo de hidroxilación involucra la dehidrogenación de la molécula de esteroide seguido de la adición de agua.

Hayano y Dorfman (104) que trabajaron con D_2O no pudieron demostrar la incorporación de deuterio.

Posteriormente Hayano y col (105) utilizando $^{18}O_2$ demostraron la incorporación del isótopo del oxígeno en forma molecular durante la 11β hidroxilación de DOC. Estos resultados fueron confirmados por Sweat y col (103).

Sweat y Lipscomb (106) demostraron el requerimiento específico de NADPH y sugirieron que el papel de los sustratos del ciclo de Krebs era la reducción de $NADP^+$ a NADPH posiblemente vía una transhidrogenasa.

Los estudios de Grant (107) utilizando polvo acetónico de mitocondrias adrenales demostraron la reducción de $NADP^+$ en presencia de fumarato y la reoxidación de NADPH en presencia de DOC. Lo que se suponía era exclusivo de microsomas resultó pues estar también presente en mitocondrias (93, 108).

Posteriormente Harding y col (109) observaron la presencia de citocromo P 450 en una fracción mitocondrial de adrenales de rata y demostraron que el succinato y malato reducían más rápidamente el citocromo que el NADPH.

Wilson y col (110) observaron que la actividad de 11β hidroxilasa era inhibida por CO.

Sin embargo, de los estudios de Wilson y Harding no quedaba claro si el CO inhibía la reducción del citocromo P 450, la generación intramitocondrial de NADPH ó la activación del oxígeno en la reacción catalizada por la 11 β hidroxilasa.

Estudios con sistemas reconstituidos permitieron aclarar la dependencia de la 11 hidroxilación del citocromo p 450 y de los electrones entre el NADPH y el oxígeno.

Cooper y col (111-112) obtuvieron una preparación de 11 β hidroxilasa sonicando mitocondrias de corteza adrenal vacuna y encontraron que el citocromo P 450 representaba el 94 % del contenido de protohemo de esa preparación.

Harding y col (113) demostraron que la mitocondria adrenal contenía los citocromos de la cadena respiratoria y que la presencia de citocromo P 450 no se debía a una contaminación microsomal.

Belt y Pease (114) y Sabatini y de Robertis (115) observaron que las mitocondrias de corteza adrenal tenían una estructura interna diferente a la de otros tejidos como hígado y corazón.

Los estudios por microscopía electrónica de corteza adrenal vacuna realizados por Bolender en 1966 demostraron la presencia de inclusiones tubuladas de la membrana además de las crestas planas vistas en mitocondrias de hígado y corazón.

Sabatini y de Robertis (115) sugirieron que las estructuras túbulo vesiculares de las mitocondrias de la corteza adrenal podrían estar relacionadas con la actividad secretoria especial que llevan a cabo esas mitocondrias.

4.3.4 SISTEMA " 18 HIDROXILASA "

Este sistema enzimático será tratado como parte integrante de los C-21 esteroides 18 hidroxilados.

5. LOS C- 21 ESTEROIDES 18 HIDROXILADOS

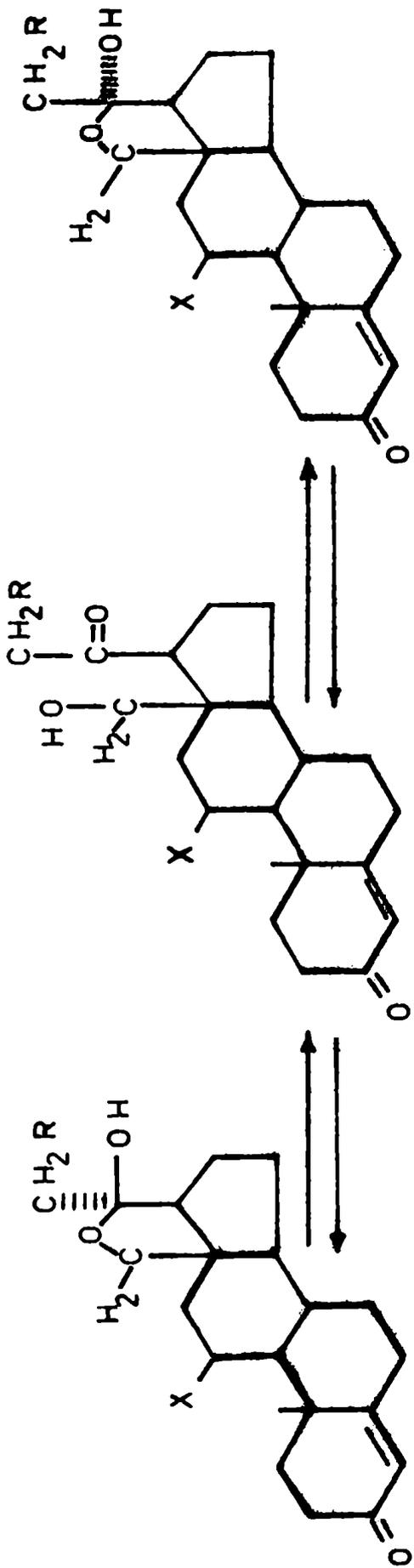
5.1. INTRODUCCION

Entre los esteroides de 21 átomos de carbono, aquellos que tienen un metilo oxidado en la posición angular C-18 poseen un carácter estructural único producido por la vecindad en el espacio de uno o varios grupos OH con una o varias funciones carbonilo (fig. 5). La conversión espontánea - como consecuencia de esta propiedad - en compuestos de naturaleza cíclica acetálica o hemiacetálica de menor energía interna que el de los isómeros abiertos, da origen a una variedad de estructuras teóricamente posibles que se incrementan con el número de funciones oxidadas y su estado de oxidación. Algunos de estos isómeros sólo pueden ser separados y caracterizados de alguna manera, por formación de derivados y por métodos de detección y separación físico químicos complejos.

Además de la posibilidad de la formación de esteroisómeros, los esteroides 18 hidroxilados de 21 átomos de C en particular, cuando se estacionan en ciertos medios lipofílicos, alcoholes y soluciones ácidas, se convierten espontáneamente y en forma reversible en estructuras altamente liposolubles cuyas propiedades cromatográficas difieren marcadamente de las del compuesto original.

Desde un punto de vista más bioquímico la 18 OH B por sí misma presenta además otra particularidad :a pesar de poseer un alcohol en C-18, intermediario entre B (metilo en C-18) y aldosterona (aldehído en C-18), es un pobre precursor del mineralocorticoide. Por otra parte, las propiedades biológicas de la 18 OH B son diferentes de las de la aldosterona, como son los ritmos circadianos y hasta cierto grado la regulación.

Contrariamente a la mayoría de las otras hormonas esteroides, en este caso el estudio de la relación entre estructura y actividad biológica está a nivel embrionario. Al menos para la 18 OH B esto no sorprende ya que se conoce poco acerca de su estructura y número de isómeros existentes. No existen además demasiados estudios sobre la actividad biológica y no hay una hipótesis de trabajo res-



- 18 OH CORTICOSTERONA : R = OH ; X = OH
- 18 OH DESOXCORTICOSTERONA R = OH ; X = H
- 18 OH PROGESTERONA R = H ; X = H

Fig.5: Estructuras de los C-21 esteroides 18 hidroxilados.

pecto a su falta de capacidad como precursor de aldosterona.

5.2 ANTECEDENTES

En 1957 Ulick y col publicaron el primero (116) de varios trabajos (116-118) sobre el aislamiento de metabolitos de aldosterona de orina humana. En ese trabajo aislan un esteroide con una función oxigenada en C-18 cuya producción fué proporcional a la secreción de aldosterona. Posteriormente se vió que se trataba de una mezcla de dos esteroides, tetrahydroaldosterona y 18 OH 11 dehidrocorticosterona.

Los autores inyectaron 18 OH B marcada en un voluntario y detectaron 18 OH THA marcada pero no tetrahydroaldosterona, demostrando de esta forma que el humano produce 18 OH B. Las actividades específicas de la 18 OH B y de la 18 THA urinarias fueron las mismas (119) .

Los estudios preliminares sobre la producción de 18 OH B comprenden incubaciones con adrenales de sapo y progesterona como precursor (120) y de adrenales de cerdo sin agregado de precursor (121). Cronológicamente se hizo una segunda serie de estudios in vitro originados en la primera década del 60 con el descubrimiento hecho independientemente por Ward y Birmingham (122) y por Péron(123) del homólogo 18 OH DOC.

La atención de ambos grupos estaba centrada en la 18 OH DOC debido a su importancia cuantitativa en ratas y la 18 OH B fué sólo parcialmente estudiada (122-124).

Mientras la 18 OH DOC es indudablemente el principal esteroide 18 hidroxilado en ratas, la mayoría de los estudios in vitro sugieren que en ratones la 18 OH B ocuparía ese lugar. Este esteroide fué caracterizado por primera vez en adrenales de ratones por Raman y col (125).

Sandor y Lanthier (126) la encontraron en incubaciones con cuartos de adrenales bovinas (zona glomerulosa) y Levy y col (127) en perfusiones de adrenales vacunas.

Estos y otros estudios (128) con adrenales bovinas han sido muy

útiles para la localización de enzimas que convierten B en 18 OHB. Aunque Sandor y Lanthier (126) sólo obtienen resultados significativos en incubaciones con zona glomerulosa, Marusic y Mulrow informan de la presencia de enzimas 18 hidroxilantes en fasciculada y reticular de adrenales bovinas (128).

En 1963 Sandor y col publican el primero (129) de dos artículos (129- 130) sobre la producción de 18 OH B en preparaciones de adrenales de pato.

Las mitocondrias de adrenales de pato son la principal fuente bioquímica de 18 OH B. Edwards y col (131) las han usado recientemente para obtener el esteroide con alta actividad específica para radioinmunoensayo.

La 18 OH B ha sido encontrada también en varios ensayos con adrenales de otros pájaros (132) pero en estas especies parecería ser de menor importancia.

El estudio de la 18 OH B en mamíferos ha sido resumido por Borruecl y col (133) quienes investigaron la esteroidogénesis con adrenales de foca antártica.

La 18 OH B fué el principal metabolito obtenido a partir de progesterona y pregnenolona radiactivas en incubaciones con cuartos de adrenales (133) .

Se vió que la oveja también segrega 18 OH B (134) y que en humanos y en perros su concentración plasmática es casi igual a la de aldosterona (135).

5.3 QUIMICA

Existe información (136-142) a cerca de la coexistencia de formas abiertas y cíclicas de la 18 OH B en mezclas naturales y sintéticas. Teóricamente, hay dos isómeros posibles para la forma abierta, una 17β (pseudo ecuatorial) y la otra 17α (pseudo axial). Estéricamente, sólo el 17β isómero puede dar la forma hemiacetálica más estable, la cual a su vez puede dar dos isómeros, estructuras 20 S y 20 R (OH) de la forma 20-18 hemiacetálica de 18 OH B. Los estudios estructurales sobre los distintos isómeros pueden entenderse mejor si se dividen en :

a) métodos dinámicos: emplean técnicas destructivas tales como reacciones químicas, formación de derivados que deben ser volátiles para ser analizados por cromatografía de gases o por espectrometría de masa.

b) métodos estáticos: implican espectroscopía no destructiva: ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

c) métodos mixtos: en los cuales parte de la molécula original de los compuestos 18 hidroxilados permanece intacta y el resto es destruida (ciertas técnicas de cromatografía gaseosa y espectrometría de masa o bien combinación de ambas).

La mayoría de los métodos dinámicos sugieren la existencia - al menos en pequeñas cantidades- de una forma abierta de 18 OH β . Esto se manifiesta por la formación de 18-21 acetatos (136) y la de dimetoximatrimetilsilileter (137) así como también por la reducción de las sales de tetrazolio (124,136), ya que sólo la forma abierta α cetólica tiene la propiedad de reducir formando formazanos.

Los métodos dinámicos revelan la existencia de equilibrio pero no dan información cuantitativa directa sobre la proporción relativa de formas abiertas y cíclicas.

Los métodos estáticos, por el contrario permiten determinar en forma cuantitativa a los componentes de la mezcla tautomérica en equilibrio.

Schmidlin y Wettstein (136) realizaron estudios de IR de 18 OH β , Kahnt y col (139), Péron (124) , Birmingham y Ward (140) y Génard y col (138,143) utilizando la misma técnica estudiaron la 18 OH DOC.

En general se puede decir que la abundancia relativa de la forma abierta en todas esas mezclas fué cercana al límite de detección o menor que el mismo. La pequeña cantidad de forma abierta de 18 OH β en la mezcla debe estar presente al menos parcialmente en la forma 17 β ya que sólo este diastereoisómero pseudo axial puede ciclarse espontáneamente hacia la estructura hemiacetalica u oxidarse con periodato dando la 18 - 20 γ lactona.

Resumiendo, las técnicas dinámicas indican la existencia de un e-

equilibrio entre la forma abierta 17β de 18 OH B y su tautómero hemiacetalico (termodinámicamente) estable, mientras que los métodos estáticos indican un fuerte predominio del último bajo las condiciones de equilibrio existentes en mezclas naturales y sintéticas. No hay información acerca del isómero 17α abierto de 18 OH B ni de la abundancia relativa de los esteroisómeros 20 S y 20 R de las formas hemiacetalicas.

Se mencionó en la introducción que los C-21 esteroides 18 hidroxilados, cuando se estacionaban en ciertos medios orgánicos, eran espontánea y reversiblemente convertidos en compuestos de baja polaridad (123,125-127,142,144-148).

Las primeras hipótesis sobre la estructura de ese compuesto de menor polaridad fueron hechas por Dominguez (142) quien analiza cuatro posibilidades. El mismo autor descarta dos de ellas quedando como probables la formación de un dímero o de un metoxiderivado. En dos trabajos (127,146) se refieren a investigaciones no publicadas realizadas por Pappo en base a las cuales la forma de menor polaridad tendría la estructura de un dímero. Esas publicaciones no dan ningún detalle ni presentan evidencias que apoyen tal dimerización.

Damasco y Lantos (145) trabajando con 18 OH B y utilizando sephadex LH 20 lograron separar ambas formas de 18 OH B observando que la forma menos polar elufa entre la forma más polar y un isoprenol de PM aproximadamente igual a 1000.

5.4 BIOQUIMICA

Debido al hecho de que la B se encuentra en el principal camino metabólico hacia la aldosterona (126,149-153), la bioquímica de la 18 OH B - un intermediario obvio, como triol - entre los dos compuestos anteriores está muy asociada con la del mineralocorticoide.

Teóricamente la conversión de B en aldosterona podría ocurrir en dos pasos, uno catalizado por una " 18 hidroxilasa " y el segundo por una " 18 hidroxidehidrogenasa ". El primero de estos pasos, ha

sido estudiado con bastante detalle, aunque el término " 18 hidroxilasa " ó " esteroide 18 hidroxilasa " es empleado en forma ambigua en muchas publicaciones.

Este cierto grado de confusión es debido a la falta de conocimiento del mecanismo molecular involucrado en los dos pasos de la reacción.

La evidencia experimental a favor de la 18 OH B como intermediario está principalmente basada en pruebas indirectas, tales como atrapamiento de metabolitos de reacción por esteroides radioinertes (154) Sin embargo la 18 OH B en experimentos directos es un pobre precursor de aldosterona. La corticosterona es de 1.5 (155) a 80 (156) veces más eficiente.

Por otra parte, aunque puede esperarse que una 18 hidroxidehidrogenasa catalice la conversión del esteroide triol en aldehído, la mayoría (157-160) pero no todos los ensayos se basan en el requerimiento de cofactores que aportan evidencias para una hidroxilasa de esteroides activada por NADPH y citocromo P 450.

5.5 ZONACION

Si bien la 18 OH B es principalmente sintetizada por la zona glomerulosa (161), al menos en adrenales bovinas, Marusic y Mulrow encontraron que también se produce en la fasciculada y reticular (128).

El otro esteroide 18 hidroxilado importante, la 18 OH DOC, es fundamentalmente derivado de la fasciculada y reticular (161,163). Se sabe que la enzima que cataliza la conversión de DOC en 18 OH DOC es la misma que 18 hidroxila la B.

La aldosterona es el único esteroide adrenal bien conocido que es sintetizado por una única zona (162).

5.6 FUENTE DE ENZIMAS Y REQUERIMIENTOS DE COFACTORES

Los estudios realizados por Psychocos y col (164) demostraron que la aldosterona era el principal corticoesteroide secretado por la

rana (120,162,165). Las preparaciones tenían un sistema enzimático muy activo tanto para aldosterona como para 18 OH B y estaban localizadas únicamente en la fracción mitocondrial.

La formación de ambos esteroides por mitocondrias adrenales de rana (164-166), oveja (155) ó rata (160) requiere NADPH (155, 160), o un sistema clásico que lo genere (160) o bien NADPH generado por la adición de NADP a los intermediarios del ciclo del ácido cítrico (164,166). En este sentido se vió que el malato era más eficiente que el fumarato (166).

Tallan y col (166) identificaron a la fumarasa como un factor estimulante para la biosíntesis de la aldosterona y observaron que se hallaba presente en la fracción soluble del homogenato de adrenales de rana.

Sin embargo existen ciertas contradicciones. Kahnt y Neher (167) encontraron que los homogenatos de adrenales bovinas cuando se incuban en presencia de NADP ó NAD convierten con velocidades similares B y 18 OH B en aldosterona.

Por otra parte Raman y col (155) observaron que, al menos con mitocondrias de adrenales de oveja, es necesario la presencia de NADP ó un sistema generante del mismo para transformar 18 OH B en aldosterona y que el NADP ó NAD estimulan la conversión de 18 OHB en 18 OH 11 dehidrocorticosterona cuyas propiedades cromatográficas son similares a las de la aldosterona.

La síntesis de ambos esteroides por mitocondrias requiere Mg^{++} . El Mn^{++} reemplaza completamente al Mg^{++} en la formación de aldosterona pero sólo parcialmente en la 18 OH B (164). El Mg^{++} puede ser reemplazado por Ca^{++} en la formación de 18 OH B pero éste último sólo restaura en pequeño grado la biosíntesis de aldosterona.

El efecto de los cationes monovalentes sobre el segundo paso de la reacción ha sido motivo de un gran número de investigaciones que se inician con los estudios de Rosenfeld y col (169) poco tiempo después del descubrimiento de la aldosterona.

Si bien la mayoría de las conclusiones son todavía tentativas se acepta en forma más o menos general que una disminución en la relación Na^+ / K^+ estimula la biosíntesis de aldosterona (169-175) y su secreción (173,176-177).

La adición de iones K^+ así como la eliminación de Na^+ parecería ejercer un efecto dual sobre la biosíntesis de aldosterona (178- 183). Los otros compuestos que estimulan la biosíntesis de la aldosterona tales como serotonina, angiotensina y las " adrenoglomerulotropinas " actúan en los primeros pasos de la biosíntesis. El ACTH actúa a distintos niveles en la biosíntesis de B y de su metabolismo (156, 184-219).

Las trofinas disminuyen in vitro la conversión de B en aldosterona en ratas (192,194,200).

En un caso de adenoma que produce aldosterona, por otra parte, el ACTH también inhibe la transformación de B en aldosterona (194).

5.7 FACTORES INHIBIDORES

Psychocos y col observaron que el agregado de homogenatos de corteza adrenal bovina y de glándulas adrenales de rata inhibían la formación de 18 OH B y de aldosterona por homogenatos de adrenales de rana hasta un 75 %. El factor inhibitorio en la adrenal bovina podía destruirse por calentamiento a 100 ° C (164).

5.8 OXIDASAS DE FUNCION MULTIPLE

Mason fué el primero que usó el término " función oxidasa mixta " para designar a las enzimas cuya acción básica involucra la introducción de un átomo o molécula de oxígeno en una molécula de sustrato concomitantemente con la oxidación de un dador de dos electrones (93).

Las esteroide hidroxilasas son oxidasas de función mixta cuyo dador de electrones es el NADPH el cual en algunos casos puede ser reemplazado por NAD.

Como se vió al tratar el tema de las otras hidroxilasas a Omura y col (220) y Estabrook y col (221) se deben la teoría de que las oxidasas de función mixta microsomales eran sistemas enzimáticos complejos cuyo sistema oxígeno terminal activado consistía en un pigmento susceptible de unirse a CO, el cual lo inactiva.

Estabrook y col (221) encontraron que el CO inhibía la 21 hidroxilación microsomal de 17 OH progesterona a DOC. Esta inhibición podía ser revertida con luz monocromática con una actividad máxima a 450 mμ. A esta longitud de onda también absorbe el pigmento unido a CO.

Los resultados obtenidos por estos investigadores apoyan la conclusión de que dicho pigmento es la oxidasa terminal de los sistemas de oxidasas de función mixta en mamíferos (221).

Como se vió antes, el citocromo P 450 no es exclusivo de los microsomas. Un sistema similar portador de electrones se encontró en mitocondrias (110,111,) donde suplementa la cadena respiratoria. También las esteroide hidroxilasas mitocondriales en la adrenal : la 11 y 18 hidroxilasas dependen del pigmento susceptible de unirse a CO para la incorporación del oxígeno molecular (110,111.).

5.9 NATURALEZA DE LAS ENZIMAS DE LA OXIDACION DEL CH₃ANGULAR C- 18 Y PRECURSORES

Sobre la base de los criterios experimentales mencionados en el punto anterior y el hecho del requerimiento de NADPH para la biosíntesis de la aldosterona, Greengard y col (222) estudiaron la posibilidad de que en los dos pasos de esta biosíntesis interviniera una oxidasa de función mixta, que como se ha visto, no es más que una oxidasa que depende del citocromo P 450.

Los autores pudieron demostrar la conversión de B en aldosterona por mitocondrias adrenales de rana.

La demostración de la participación del citocromo P 450 es la evidencia más importante empleada por Estabrook y col para la existencia de oxidasas de función mixta microsomales.

Después que se encontró que la hidroxilación tenía lugar durante la formación de aldosterona a partir de B, Greengard y col (222) postularon que la 18 OH B era un precursor inmediato del mineralocorticoide, dando por entendido que el segundo paso era catalizado por una 18 OH dehidrogenasa.

Por otra parte Marusic y col sostienen más recientemente (173)

que la conversión de 18 OH B en aldosterona se debe a una oxidasa de función múltiple más que a una dehidrogenasa.

La cuestión de la enzima ó enzimas que catalizan la conversión de 18 OH B en aldosterona está estrechamente ligada a la naturaleza del precursor del mineralocorticoide. .

Una razón de la pobre capacidad precursora de la 18 OH B puede ser el hecho de encontrarse en su forma abierta hemiacetálica. Esta estructura, que no posee OH en C-18 no favorece la conversión por una dehidrogenasa.

Por otra parte es posible la necesidad de una " segunda 18 hidroxilasa " postulada por Marusic y col para la introducción de un OH adicional en C-18 el cual permitiría la formación del puente oxígeno entre C-18 y C-11.

Por el contrario en la conversión NADP dependiente observada por Kahnt y Neher (167) es probable que esté involucrada en el segundo paso una 18 OH dehidrogenasa.

En principio ambas enzimas podrían estar presentes en la corteza adrenal y su actividad podría estar modulada por diferentes condiciones fisiológicas, la hidroxilasa requiere una estructura hemiacetálica para la 18 OH B y un nucleótido reducido y la dehidrogenasa NADP y una forma abierta del precursor. Esta última estructura puede no ser estable en el medio de incubación (fig. 6).

El hecho se complica aún más debido a que una de las formas menos polares de 18 OH B se transformó en aldosterona más rápidamente que la forma hidrofílica comúnmente aislada (145) y por recientes hallazgos de Aupetit y col (168) según los cuales la 18 OH B " endógena " sería menos efectiva como precursor de aldosterona que la 18 OH B " sintética " .

La elucidación de la estructura de la forma menos polar podría ayudar a resolver este problema en sus aspectos principales.

5. IOBIOLOGIA

Es muy poco lo que se conoce acerca de la función fisiológica de la 18 OH B en vertebrados.

Aunque en humanos la secreción de 18 OH B responde en general, al

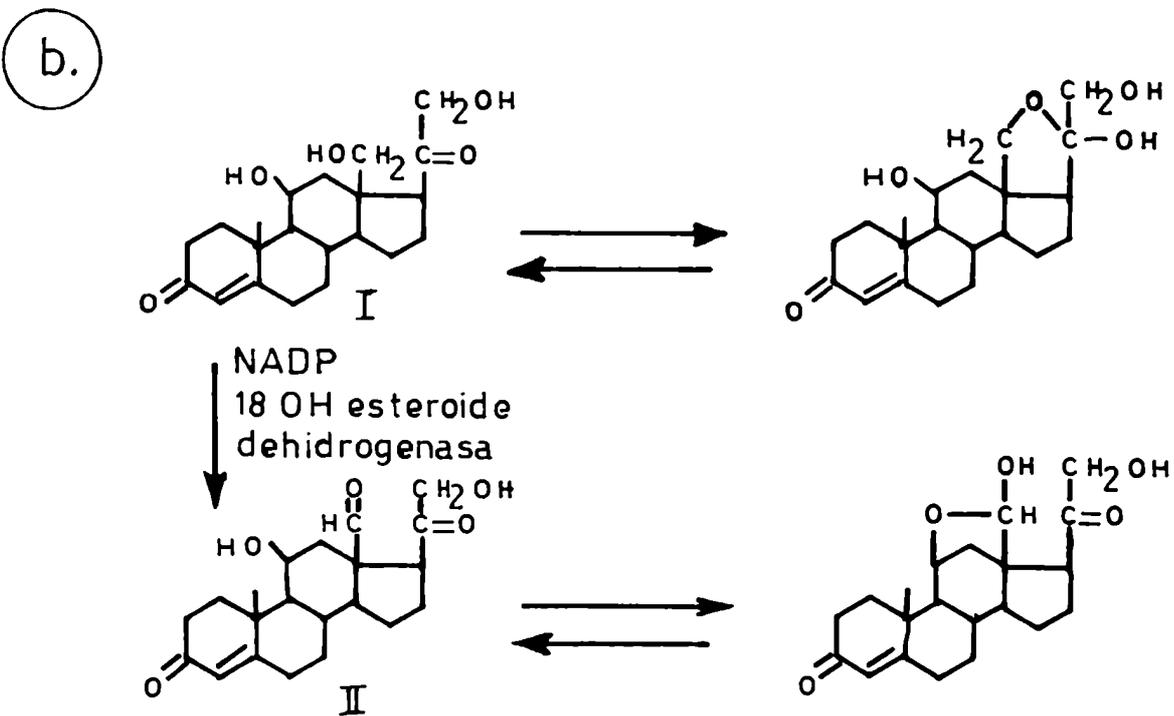
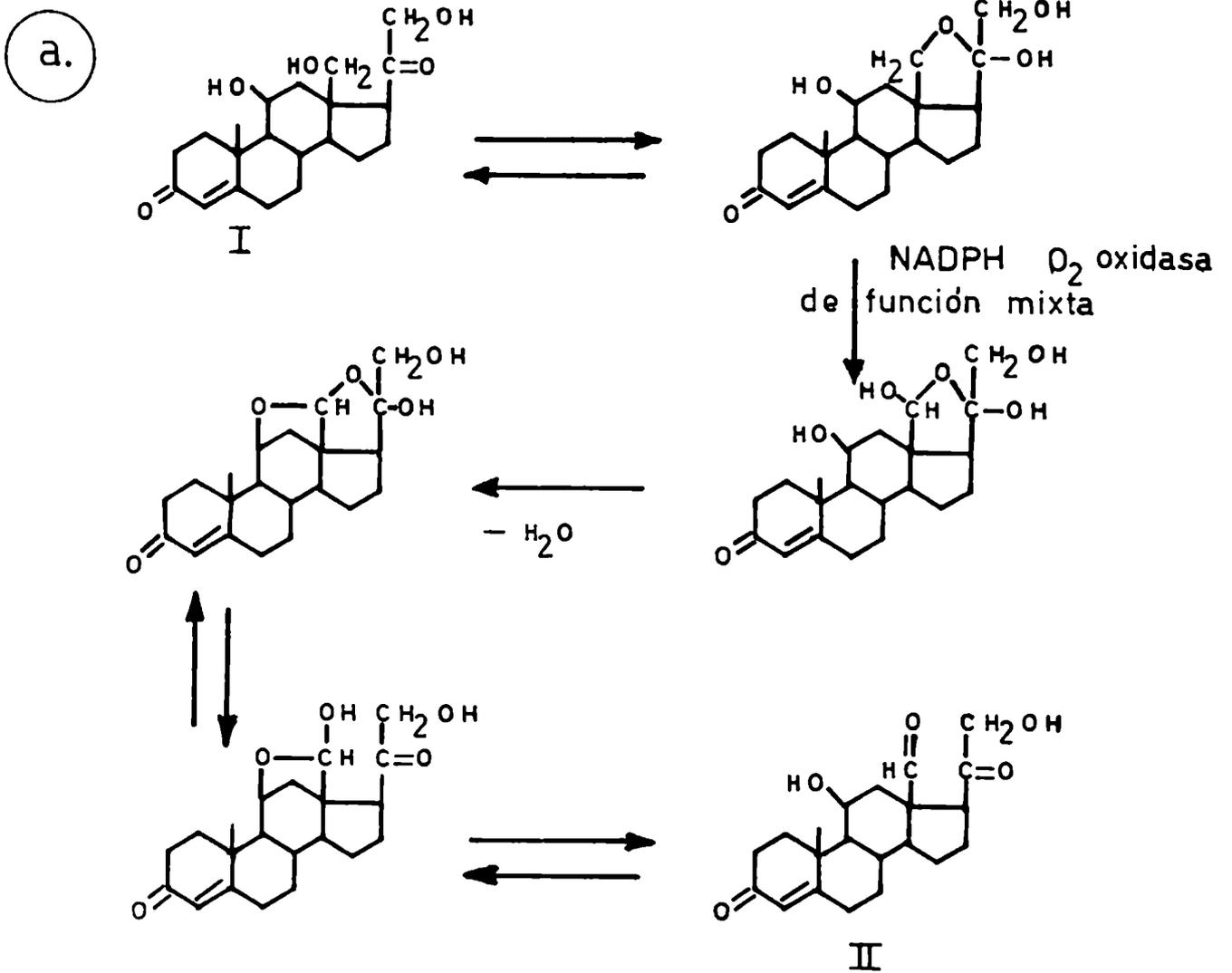


Fig.6: Probables caminos biosintéticos para la conversión de 18. OH B (I) en aldosterona (II).

mismo estímulo que la secreción de aldosterona vide infra , no existen hasta el momento pruebas de efectos biológicos similares para los dos esteroides.

Lanthier y Sandor observaron que la administración de 18 OH B a patos aumenta el volumen de secreción de su glándula de secreción de sal y por consiguiente la salida total de Na^+ (223).

En estudios recientes con ratas adrenalectomizadas (224) se encontró un aumento significativo en la salida del Na^+ urinario luego de inyectar a los animales con dosis de 3 ug del esteroide. Con dosis mayores se observa un efecto contrario.

En niños que poseen una biosíntesis de aldosterona defectuosa, caracterizada por una pérdida excesiva de Na^+ , la secreción de 18 OH B, o la excreción de sus metabolitos urinarios, está considerablemente aumentada (225-229).

Un segundo efecto de este esteroide ha sido señalado recientemente sobre la salida total de H^+ titulables en la orina de ratas adrenalectomizadas (224).

PLANTEO DEL TRABAJO

El presente trabajo tiene por objeto tratar de elucidar algunos problemas importantes estrechamente vinculados con la biosíntesis de la aldosterona. Esta, así como los diversos pasos metabólicos que conducen a la formación de la mayoría de las hormonas esteroideas es ciertamente muy compleja. Entre tales hormonas, la aldosterona es de vital importancia para la supervivencia del hombre y de numerosas especies animales, por ser el principal mineralocorticoide conocido; sin embargo, hasta el momento se desconoce en detalle el mecanismo mediante el cual tiene lugar esta biosíntesis.

Se resumen a continuación algunos conceptos expresados anteriormente que constituyen el fundamento de este trabajo: la 18 hidroxicorticosterona debería ser el precursor inmediato lógico de la aldosterona, dadas su estructura química por una parte, y el hecho comprobado de que la corticosterona se convierte en aldosterona más fácilmente que otros esteroides relacionados estructuralmente.

Además, la 18 hidroxicorticosterona posee probablemente per se propiedades fisiológicas relacionadas con el control del equilibrio ácido-base, según está descrito en la literatura. Este esteroide, así como otros 18-hidroxilados, presenta distintas formas o derivados frecuentemente interconvertibles por tratamiento con soluciones alcohólicas o acuosas, acidificadas o no, cuyas propiedades y estructuras no eran conocidas hasta el presente, habiendo sido objeto de variadas hipótesis en cuanto a estructura y función.

Es posible que alguna o algunas de estas formas sean las responsables verdaderas de su acción biológica, tanto como precursores de la aldosterona como agentes fisiológicos activos.

Este trabajo constituye el primer estudio sistemático acerca de estos derivados de la 18 OH B, en cuanto a su estructura y propiedades, describiéndose por primera vez la existencia de varias formas nuevas. De tal modo, abre el camino para el estudio de algunas de estas y de otras formas provenientes de otros esteroides 18-hidroxilados, tales como 18 OH DOC, 18 OH Prog, así como de sus propieda-

des, estructura y función.

De lo dicho se desprende el interés del estudio de las distintas formas o derivados interconvertibles de este esteroide.

PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIALES

Tolueno: Merck p.a., Baker p.a., Sintorgan (a).

Propilenglicol: Mallinckrodt p.a.(a).

Metanol: Merck p.a., Sintorgan (a).

Azul Nilo: donación de la 2º. cátedra de Histología de la Facultad de Medicina U.B.A.

Sudan III: Pat red 7 B Sigma

Benceno: Sintorgan p.a.(a).

Agua: Se utilizó agua deionizada o a veces deionizada y destilada sobre vidrio.

Heptano: Sintorgan p.a.

Ciclohexano: Merck p.a.

Dioxano: Sintorgan puro para uso cromatográfico.

Acetato de etilo: Merck p.a.

Sílica gel G: Merck para cromatografía.

Sílica gel G F 254 (tipo 60): Merck para cromatografía

Cloruro de metileno: Merck p.a., Sintorgan (a).

PPO: Packard para grado de centelleo.

dimetil POPOP: Packard para grado de centelleo.

Córticosterona: Proveniente de Sigma Chemical CO.(U.S.A.).

1-2³H-B: Proveniente de New England Nuclear (Boston, Mass, U.S.A.).

4-¹⁴C-B: Proveniente de New England Nuclear (Boston, Mass, U.S.A.).

Cloruro de sodio: Merck p.a.

Cloruro de potasio: Merck p.a.

Fosfato monopotásico: Baker p.a.

Sulfato de magnesio: Schering-Kahlbaum p.a.

Bicarbonato de sodio: Mallinckrodt p.a.

Cloruro de calcio: Merck p.a.

Dextrosa: Mallinckrodt p.a.

Aldosterona: Proveniente de Ikapharm, Ramat-Gan, Israel.

4-¹⁴C aldosterona: Proveniente de New England Nuclear (Boston, Mass, U.S.A.).

Nitrógeno: de grado N°. 4.

Anhidrido acético: Mallinckrodt p.a.

Piridina: Carlo Erba p.a.

Acido periódico: Merck p.a.

Acido sulfúrico: Merck p.a.

Cloruro estañoso: Mallinckrodt p.a.

Acido clorhídrico: Merck p.a.

Oxido crómico: Baker p.a.

Acético glacial: Merck p.a.

Etanol: Carlo Erba p.a. (a).

4-¹⁴C desoxicorticosterona: Proveniente de New England Nuclear,
(Boston, Mass, U.S.A.).

Tetrahidrofurano: Merck p.a.

³H₂O: Donación de la Comisión Nacional de Energía Atómica

¹⁴CH₃OH: Donación de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Butanol: Carlo Erba A.R. (a).

18 Hidroxicorticosterona: Proveniente de Ikapharm, Ramat-Gan, Israel.

1-2 ³H-18 OH B: Se biosintetizó según se describe en Métodos.

4-¹⁴C-18 OH B: Se biosintetizó según se describe en Métodos.

Adrenales de rata: Se utilizaron ratas Wistar.

Papel Whatman N° 1: para cromatografía.

(a): previamente rectificado.

2.METODOS

A.Sistemas cromatográficos

a.Cromatografía descendente en papel

a 1.Sistema TPG : (Tolueno:propilenglicol 3:1) (230)

Se utilizó cromatografía descendente en papel Whatman N°1 en el sistema TPG (230).

El papel empleado consiste en una cortina con diferente número de tiras.Se utilizaron tiras de 0.5, 1 y 2 pulgadas de ancho para adaptarlas a los carretes del radiocromatógrafo.El largo de las tiras fué de 45 cm.

Las tiras se mojaron previamente en una mezcla de PG:MeOH (1:2). Para ello se sumergieron en una navecilla que contenía la solución antes mencionada.

El exceso de líquido se eliminó secando ligeramente las tiras sobre papel de filtro.

Se sembraron luego los colorantes,patrones y muestras a analizar. Las determinaciones cualitativas se hicieron sembrando en punto y las cuantitativas sembrando en bandas de diferente longitud de acuerdo al ancho de tira utilizado en cada caso.

Una vez sembrado se colocaron las cortinas en la cuba de cromatografía dejando estabilizar durante 3 horas aproximadamente y se desarrolló el cromatograma en el sistema antes descrito durante 6 a 8 horas en un cuarto termostatzado a 31 ° C.

Finalizada la corrida se dejó secar el papel durante varias horas. La detección de los compuestos radiactivos se hizo mediante el empleo de un radiocromatógrafo.

Cuando se analizaron muestras radioinertes se las detectó por su absorción al UV.

En ambos casos se procedió a eluir los compuestos como se indicará más adelante.

Este sistema fué empleado para a) purificación del precursor, corticosterona b) análisis de los extractos de incubación c) separación de las dos formas de 18 OH desoxicorticosterona d) lactonas de 18 OH corticosterona.

a 2. Sistema Bush B₅ : (Benceno:metanol:agua 1:0.5:0.5) (231)

Al igual que como se describió antes se utilizaron cortinas de papel Whatman N°1 de diferentes anchos y 45 cm de longitud.

En este caso se sembraron directamente los colorantes, patrones y muestras, de manera análoga a la descrita anteriormente.

Se dejó estabilizar durante 1 hora y se desarrolló el cromatograma durante 5 a 6 horas aproximadamente en un cuarto termostaticado a 31 ° C.

La detección y elución de los compuestos se realizó como se detalló en al.

Este sistema fué empleado para a) analizar la zona del origen del cromatograma analizado previamente en el sistema TPG de los extractos de incubación b) separación de las diversas formas de 18 OH B.

a 3. Sistema Bush B₁: (Heptano:tolueno:metanol:agua 5:5:7:3)(231).

La forma de trabajo fué similar a la descrita para el Bush B₅, excepto que los tiempos de corrida fueron mayores, aproximadamente 8 horas.

Este sistema fué utilizado para analizar los acetatos de las dos formas de distinta polaridad obtenidas en metanol de 18 OH B.

a 4. Sistema Bush A: (Heptano:metanol:agua 5:4:1) (231).

La forma de trabajo fué similar a la descrita para el sistema Bush B₅, excepto los tiempos de desarrollo que fueron aproximadamente 10 horas pues fué necesario hacer la corrida cromatográfica con " overflow ".

Este sistema fué utilizado para la purificación del precursor de-soxicorticosterona.

a 5. Sistema " Cy-Di I ": (Ciclohexano:dioxano:metanol:agua 4:4:2:1) (232)

La forma de trabajo fué similar a las descriptas anteriormente para los sistemas denominados Bush, Los tiempos de desarrollo oscilaron entre 12 y 16 horas.

Este sistema fué utilizado para analizar los acetatos de aldosterona.

a 6. Sistema " Cy-Bz ": (Ciclohexano: benceno: metanol: agua 4:3:4:1) (232).

La técnica seguida fué similar a las descritas anteriormente. Los tiempos de desarrollo fueron aproximadamente 8 horas.

Este sistema se utilizó para analizar la lactona de los acetatos de aldosterona.

B. Cromatografía en placa delgada

b 1. Sistema Heptano: acetato de etilo (3:1) (233).

Se utilizaron placas de 5 x 20 cm y 0.5 mm de espesor.

La preparación contenía gel de sílica GF 254 y gel de sílica G , en relación 1:3. Las placas se activaron durante 1.5-2 horas en estufa a 110 °C.

El tiempo de corrida fué de aproximadamente 1 hora en un cuarto termostatzado a 31 °C.

Este sistema se empleó para purificar progesterona y separar las dos formas o derivados de 18 OH Progesterona.

C. Detección de los esteroides en los cromatogramas

Los esteroides radioinertes que absorben a 240 nm ($\Delta 4-3$ ceto) se detectaron con una lámpara UV adecuada (mineraligh short Wave UV S-11) utilizando la emisión principal a 253,7 nm (onda corta). El papel fluoresce ligeramente con una emisión azulada y la mancha oscura que identifica la posición del esteroide por contraste, es debida a la absorción de la radiación de excitación.

Cuando se utilizó cromatografía en placa delgada se empleó el mismo principio agregando un indicador de fluorescencia (sílica gel GF 254).

Los esteroides radiactivos fueron ubicados sobre los cromatogramas en papel o placa delgada mediante un radiocromatógrafo "scanner" Packard Modelo 7201.

D.Elución de los compuestos

El método de elución empleado fué discontinuo. Las zonas del cromatograma en papel que contenían los esteroides fueron cortadas en cuadraditos de aproximadamente 0.5 cm de lado y puestas en erlenmeyers de 25 ml.

El solvente de elución fué en general metanol y en algunos casos cloruro de metileno ó mezcla de ambos.

Los erlenmeyers tapados fueron puestos en un agitador. Al cabo de 15 minutos se volcaron los eluidos en tubos y se agregó nuevo solvente de elución. Este proceso se repitió tres veces.

Se determinó previamente que bajo estas condiciones se recupera el 99 % del material.

Cuando se hizo cromatografía en placa delgada, la zona que contenía los compuestos fué separada del resto de la placa con ayuda de una espátula.

Este material se colocó en erlenmeyers para ser eluido de la misma manera que se describió anteriormente. El líquido de elución se filtró a través de embudos conteniendo lana de vidrio en el vástago.

Sobre alícuotas de estos eluidos se realizaron las mediciones de radiactividad en un contador de centelleo líquido como se indicará más adelante.

Los eluidos fueron concentrados bajo N_2 en baño termostatzado a 37 ° C, salvo donde se especifique otra cosa.

B. Medición de la radiactividad

e 1 .Equipos utilizados

La determinación de actividad de las muestras que contenían ^3H , ^{14}C ó mezcla de ambos fué realizada en espectrómetros β de centelleo líquido Packard con 3 canales.

Se utilizaron en diferentes oportunidades dos aparatos a) Tri Carb Modelo 3003 no dotado de " Standard " externo b) Modelo 3003 equipado con " Standard " externo, según su disponibilidad.

e 2. Preparación de las muestras

Las muestras a medir se colocaron en viales de vidrio de bajo contenido en potasio y se llevaron a sequedad bajo aire. Luego se añadió a cada vial 10 ml de solución centelladora que contenía 4 gr/l de PPO y 0.25 gr/l de dimetil POPOP en tolueno de calidad adecuada para este propósito (234-236).

Los viales previamente tapados y agitados se dejaron durante por lo menos 10 minutos antes de leer en el espectrómetro, manteniéndolos en la oscuridad y a baja temperatura para disminuir el fondo, especialmente cuando se medían radiaciones β de baja energía.

e 3. Elección de parámetros óptimos

e 3.1. Calibración de la ganancia

Fijando una ventana 50-1000, para evitar en lo posible tanto el ruido electrónico como el de radiación exterior de alta energía, se seleccionó la ganancia con la cual se obtiene el valor de cifra de mérito = $\left(\frac{\text{eficiencia}}{\text{fondo}} \right)^2$ para muestras sin "quenching" (patrones de ^3H y ^{14}C separadamente).

Esta ganancia muy aproximadamente coincide con la de mayor número de cpm leídas en cada caso. En dichas condiciones la sensibilidad del método es máxima y no influyen de modo apreciable pequeñas variaciones en la amplificación electrónica (ganancia) debidas a inestabilidad del sistema y falta de reproducibilidad del potenciómetro selector de ganancia.

En dichas condiciones también es óptima la relación señal ruido del sistema.

e 4. Corrección del "quenching" para un sólo radioisótopo

e 4.1. Método de la relación de canales

Se empleó este método cuando no se dispuso de "standard" externo, por ser el de elección en tal caso (235-238).

Se utilizó un juego de patrones de actividad absoluta conocida del núcleo a determinar, con diferentes grados de "quenching".

Se midieron simultáneamente en 2 canales cada uno de los patrones utilizando la misma ganancia. En el 1er. canal ó canal de medición se utilizó una ventana abierta (50-1000) y en el 2do. canal ó canal de monitoreo se utilizó una ventana más angosta (para ^{14}C se modificó el valor del discriminador base a aproximadamente 100 divisiones; para ^3H en cambio se modificó el valor techo a 250 divisiones, manteniendo en ambos casos el otro discriminador igual que en el canal de medición).

La ventana del canal de monitoreo fué elegida de modo de obtener una relación aproximadamente lineal entre la eficiencia de medición en el canal de medición (h_1 y c_1 para ^3H y ^{14}C respectivamente) y la relación de canales:

Actividad neta aparente (cpm) en canal monitoreo

Actividad neta aparente (cpm) en canal medición

Tal relación de canales es obviamente idéntica a la relación de las eficiencias correspondientes, denominándose h_2 y c_2 a las eficiencias de ^3H y ^{14}C en el canal de monitoreo.

La pendiente de la recta obtenida es negativa para ^3H (h_1 vs h_2/h_1) y positiva para ^{14}C (c_1 vs c_2/c_1) trabajando de tal modo (figuras 7 y 8).

Las muestras que contenían los esteroides se midieron bajo condiciones idénticas, y una vez determinada la relación de canales que le corresponde, por interpolación en la curva del núcleo en cuestión se obtuvo el valor de la eficiencia de medición, con lo cual se calculó la actividad absoluta.

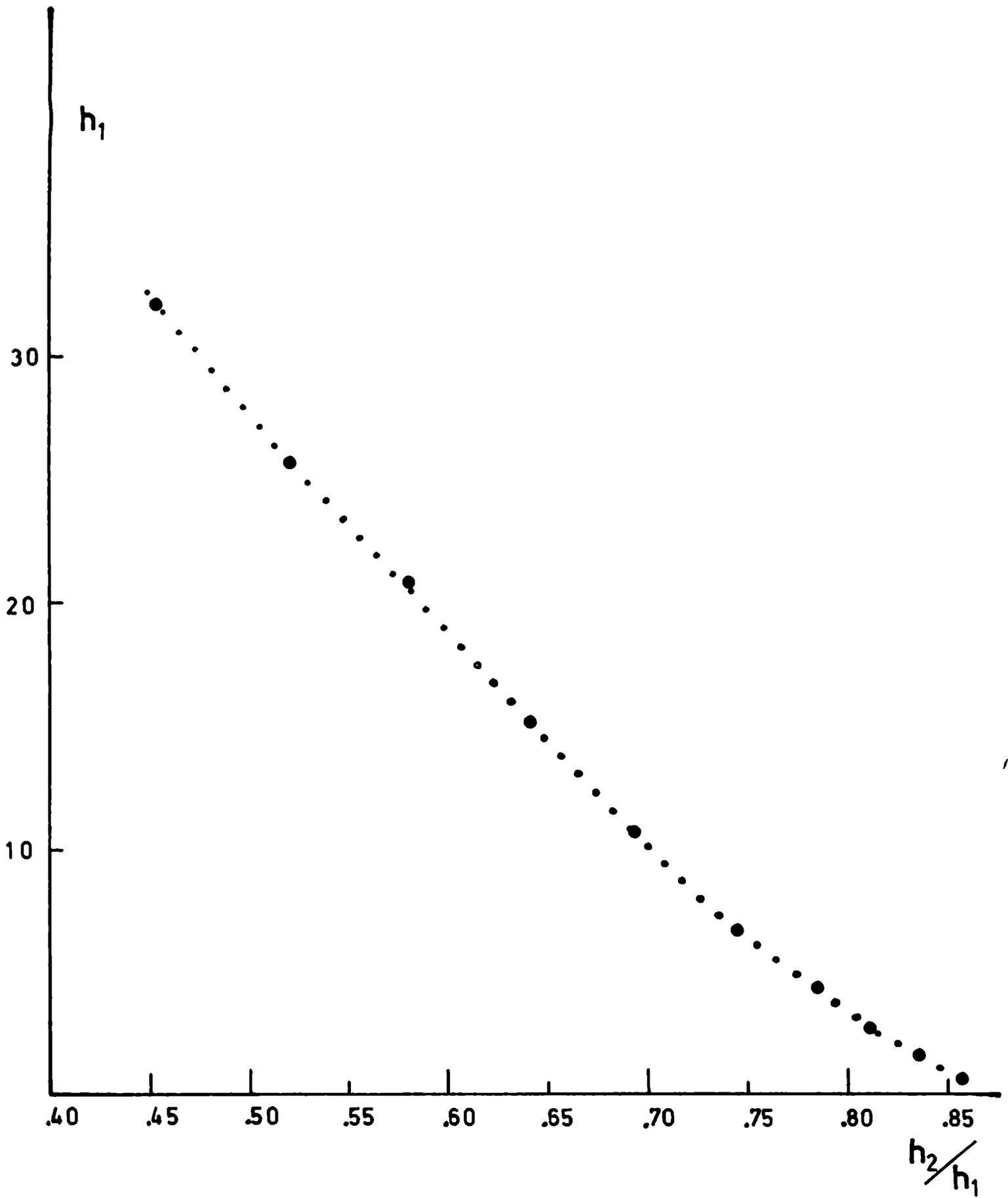


Fig.7: Medición de ^3H mediante el método de relación de canales.

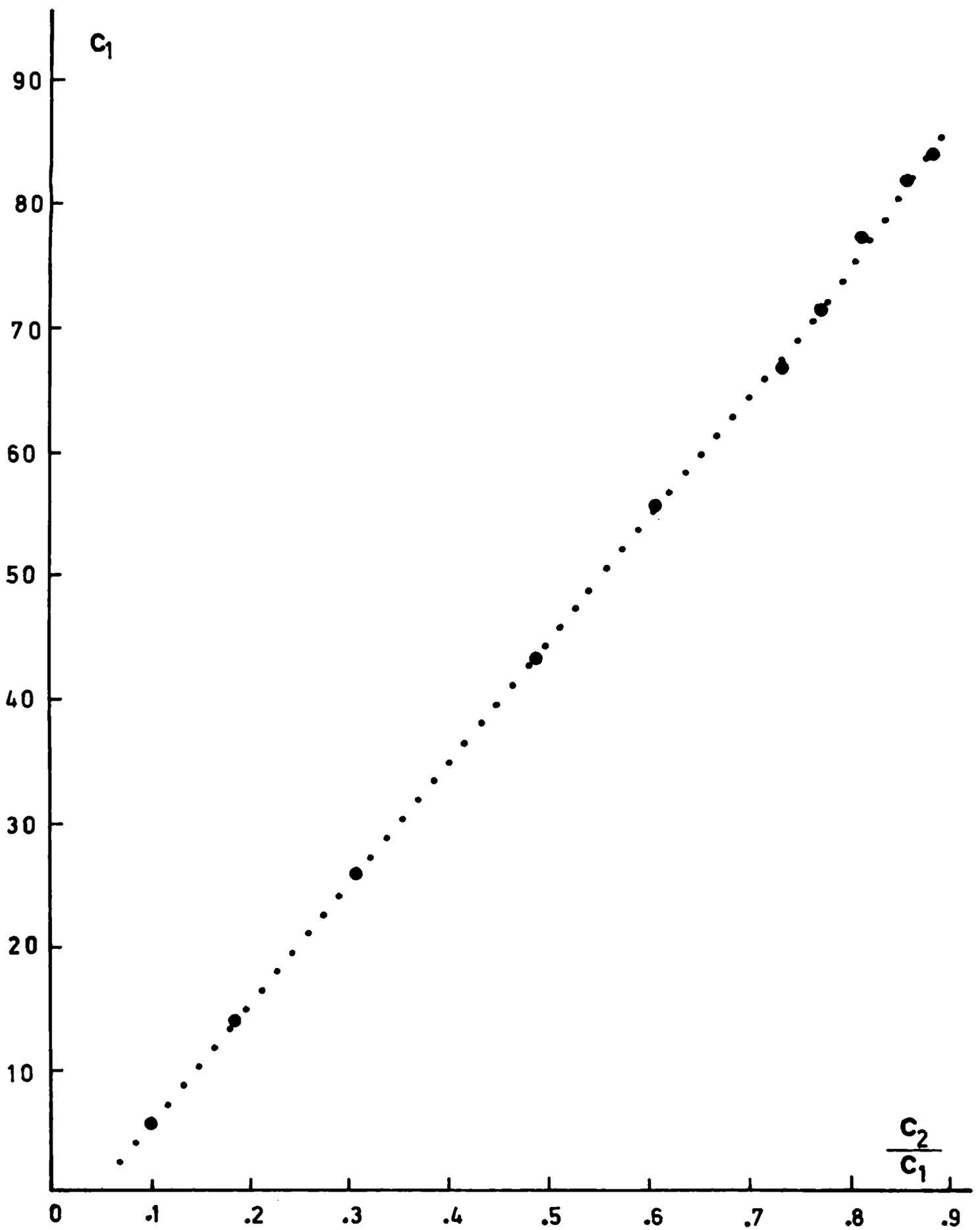


Fig.8: Medición de ^{14}C mediante el método de relación de canales.

e 4.2. Método del "standard" externo (239-242)

Se utilizaron 3 canales, el iro. en condiciones óptimas de medición para el núclido y los dos restantes en condiciones adecuadas para la determinación de la relación de actividades aparente netas del "standard" externo (r.s.e.);

r.s.e. Actividad aparente neta del S.E. en canal angosto
Actividad aparente neta del S.E. en canal ancho

El espectro β aparente del "standard" externo, generado por efecto Compton a partir de la radiación γ emitida por el "standard" es de energía elevada, por lo cual su medición se realizó con baja ganancia (3%).

El valor de r.s.e. así definido no supera 0.5 si se eligen para el canal ancho una ventana de 100-1000 y para el canal angosto una de 300-1000. En tales condiciones las curvas de eficiencia vs r.s.e. para ambos núclidos permiten convenientemente la determinación de la actividad absoluta de una muestra, puesto que pequeñas variaciones de eficiencia (variación en el "quenching") se traducen en variaciones apreciables de la r.s.e. La relación es biunívoca por ser prácticamente independiente del mecanismo de "quenching"; por otra parte las muestras con que se trabajó no presentaron color apreciable nunca y el "quenching" de color es aquel que produce mayores desviaciones de la curva de eficiencia vs r.s.e.

Para determinar estas curvas se procedió de modo análogo al empleado en el método de la relación de canales antes descripto.

Utilizando un juego de patrones con distinto grado de "quenching" para cada isótopo se obtuvieron las curvas de eficiencia vs r.s.e. correspondientes para cada uno de ellos.

Cada vial patrón se midió en las condiciones descriptas en presencia y ausencia del "standard" externo. Dado que la actividad del "standard" es muy elevada, el contaje con el "standard" colocado se realizó durante sólo 1 minuto.

Como antes, de la actividad aparente (cpm) del patrón obtenida en ausencia del "standard" externo se calcula la eficiencia de la medición; los valores registrados en los canales ancho y angosto correspondientes al "standard" externo, siempre en ausencia de éste se descontaron de los obtenidos en su presencia para obtener las

actividades netas con las cuales se calculó la r.s.e.

Para la medición de la actividad absoluta de las muestras mediante esta técnica, se procedió de manera análoga a la descrita para los patrones, y con el valor de r.s.e. obtenido se determinó la eficiencia por interpolación en la curva correspondiente al núcleo.

En las figuras 9 y 10 se muestran las curvas obtenidas de las eficiencias de cada uno de los isótopos en función de r.s.e.

e.5. Corrección del "quenching" para mezclas de dos radioisótopos

e.5.1. Mediante el método de la relación de canales (243)

Este problema solamente puede resolverse si las energías β máxima de los radioisótopos presentes son apreciablemente diferentes. Tal condición es satisfecha afortunadamente por el par ^3H : ^{14}C , por ser sus energías máximas iguales a 0.018 MeV y 0.155 MeV respectivamente (relación 1:8.6).

Mientras no se dispuso de un equipo con "standard" externo la resolución de mezclas se logró utilizando una técnica puesta a punto en colaboración con el Dr. Guillermo A. Locascio, basada en la determinación del grado de "quenching" mediante relación de canales para el isótopo de mayor energía, con exclusión del de menor energía en estos canales. En el 1er. canal se determinó la actividad aparente del isótopo de menor energía con ayuda de una curva que permite descontar la actividad aparente neta del isótopo de mayor energía en este canal.

Este 1er. canal opera con ventana y ganancia óptima para el ^3H determinadas como se mencionó anteriormente. En los otros 2 canales, que se operaron con la ganancia óptima para ^{14}C , se excluyó al tritio empleando un valor de discriminador base suficientemente elevado y que resultó ser de 250. Para medición de ^{14}C exento de ^3H se empleó una ventana 250-1000 y para monitoreo 250-400. La relación entre las actividades netas aparentes en estos canales, c_3/c_2 , es función del grado de "quenching".

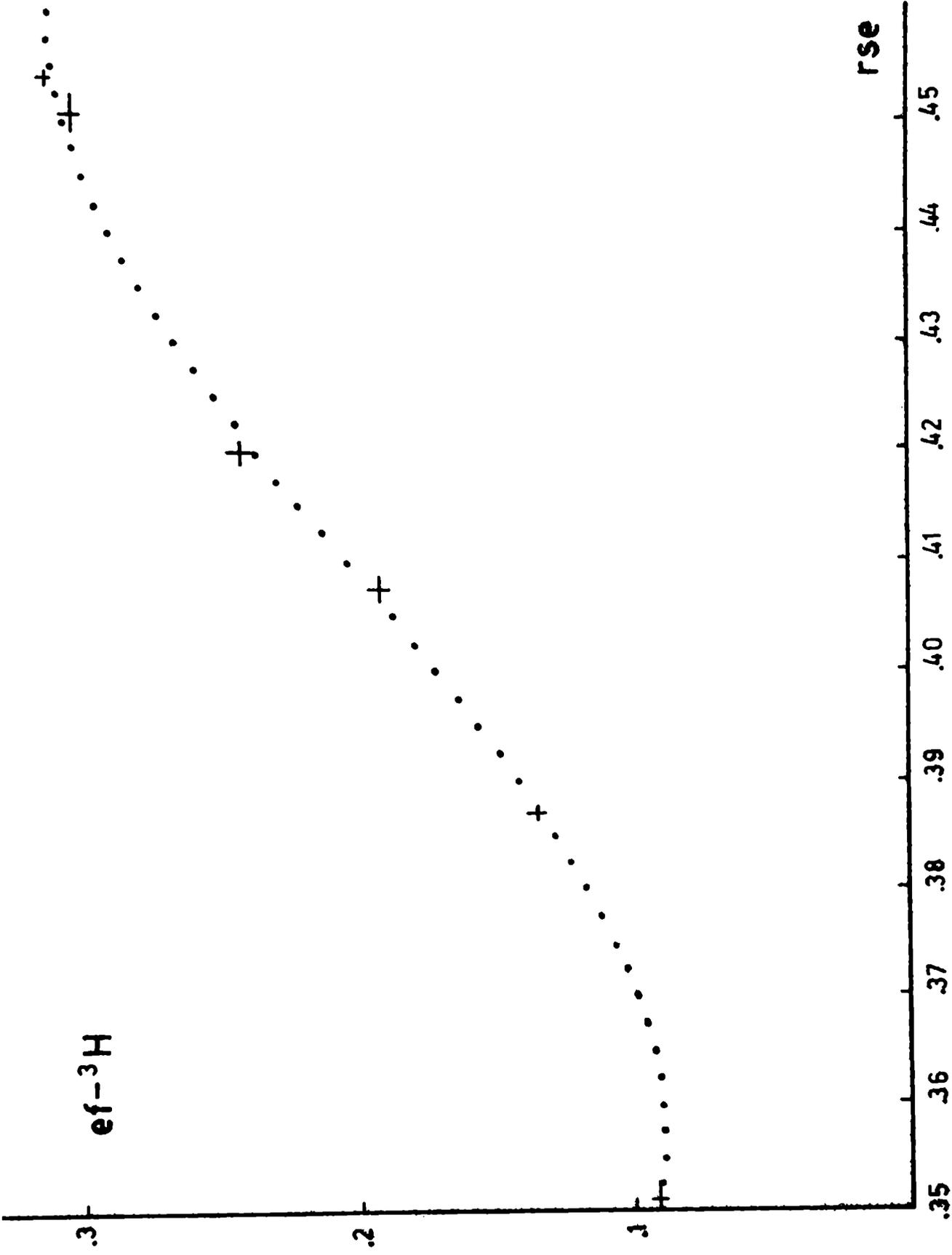


Fig.9 : Eficiencia de 3H en función de la relación de actividades aparentes notas del standard externo.

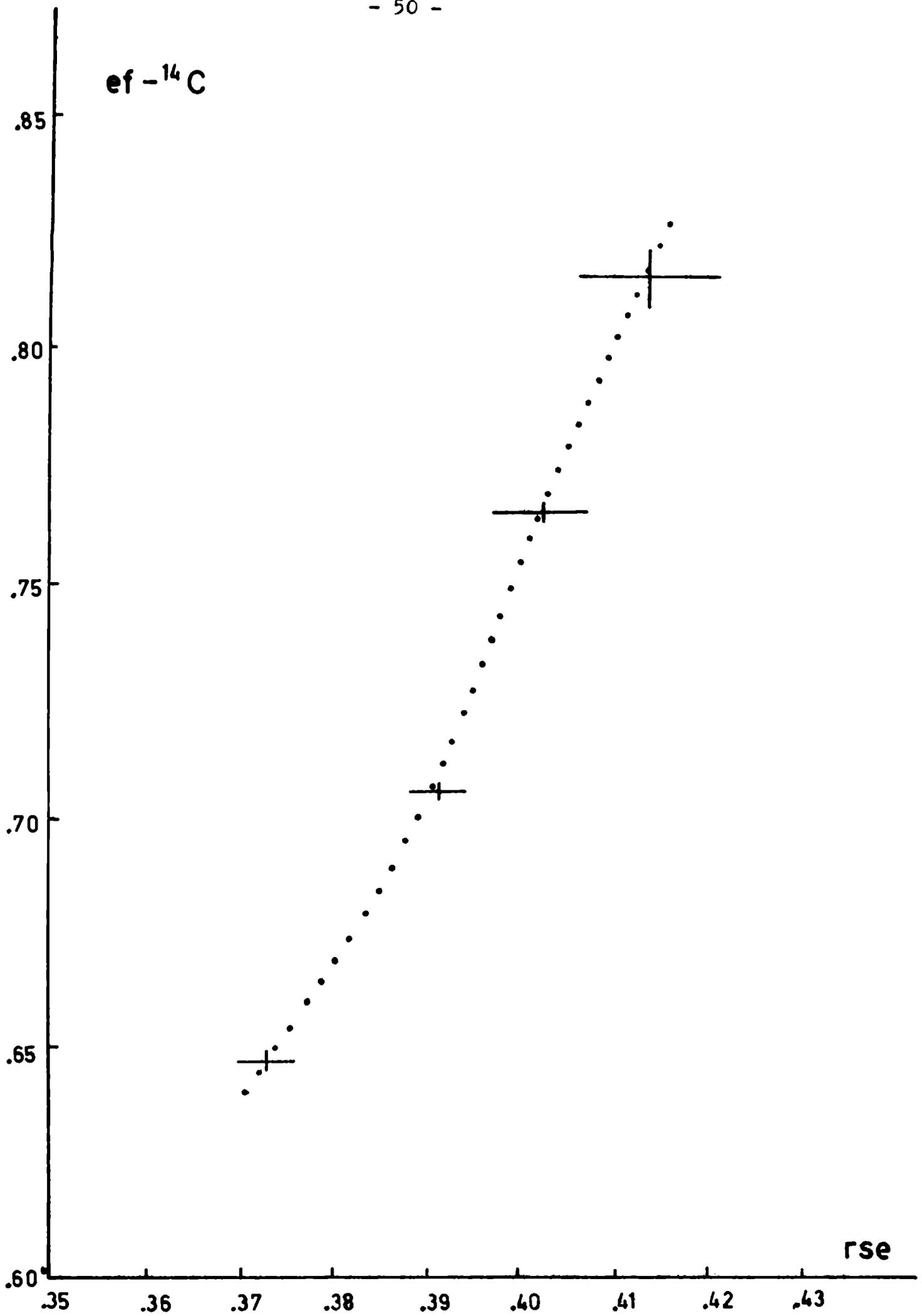


Fig.10 :Eficiencia de ¹⁴C en función de la relación de actividades aparentes netas del standard externo.

Se graficó c_2 , eficiencia de medición de ^{14}C , en el canal de medición de este núcleo vs c_3/c_2 utilizando una serie de patrones de ^{14}C con diferente grado de "quenching". La eficiencia del ^3H en el canal de medición de tritio, h_1 también se graficó contra esta relación de canales empleando patrones de ^3H del mismo grado de "quenching" que los de ^{14}C . (fig. 11 y 12).

Dado que es imposible contar ^3H con exclusión de ^{14}C , se obtuvieron las actividades aparentes netas de ^3H descontando de la actividad total aparente medida en el canal 1, la actividad de ^{14}C en dicho canal de medición de ^3H ; la curva necesaria de actividad aparente de ^{14}C en el canal de medición de ^3H / actividad aparente de ^{14}C en el canal de medición de ^{14}C (c_1/c_2) en función de la relación de canales "quenching" se obtuvo de la lectura en este canal de medición de ^3H de la actividad aparente de los patrones de ^{14}C con diferente grado de "quenching". (fig 13).

e.5.2. Resolución de mezclas de dos radioisótopos utilizando "standard" externo (244-248)

Con un espectrómetro equipado con "standard" externo se procedió de la manera siguiente: 1) Se determinaron los puntos de balance para los patrones de ^3H y ^{14}C sin "quenching" en el canal 1 como se describió previamente (parámetros óptimos de ganancia para ventanas 50-1000) en el canal de medición.

2) Con juegos separados de patrones de cada radioisótopo que contengan cantidades crecientes de agente productor de "quenching" (nitrometano) se trazaron los siguientes gráficos:

- a) Curva de eficiencia de ^3H (h_2) en función de r.s.e.
- b) Curva de eficiencia de ^{14}C (c_1) en función de r.s.e.
- c) Usando el juego de patrones de distinto grado de "quenching" de ^3H , se representó el cociente entre la eficiencia h_1 de cada patrón medido con parámetros óptimos para ^{14}C , y la eficiencia h_2 del mismo patrón medido con parámetros óptimos para ^3H , en función de r.s.e.
- d) Análogamente, con el juego de patrones de distinto grado de "quenching" de ^{14}C , se representó el cociente entre la eficiencia c_1 de

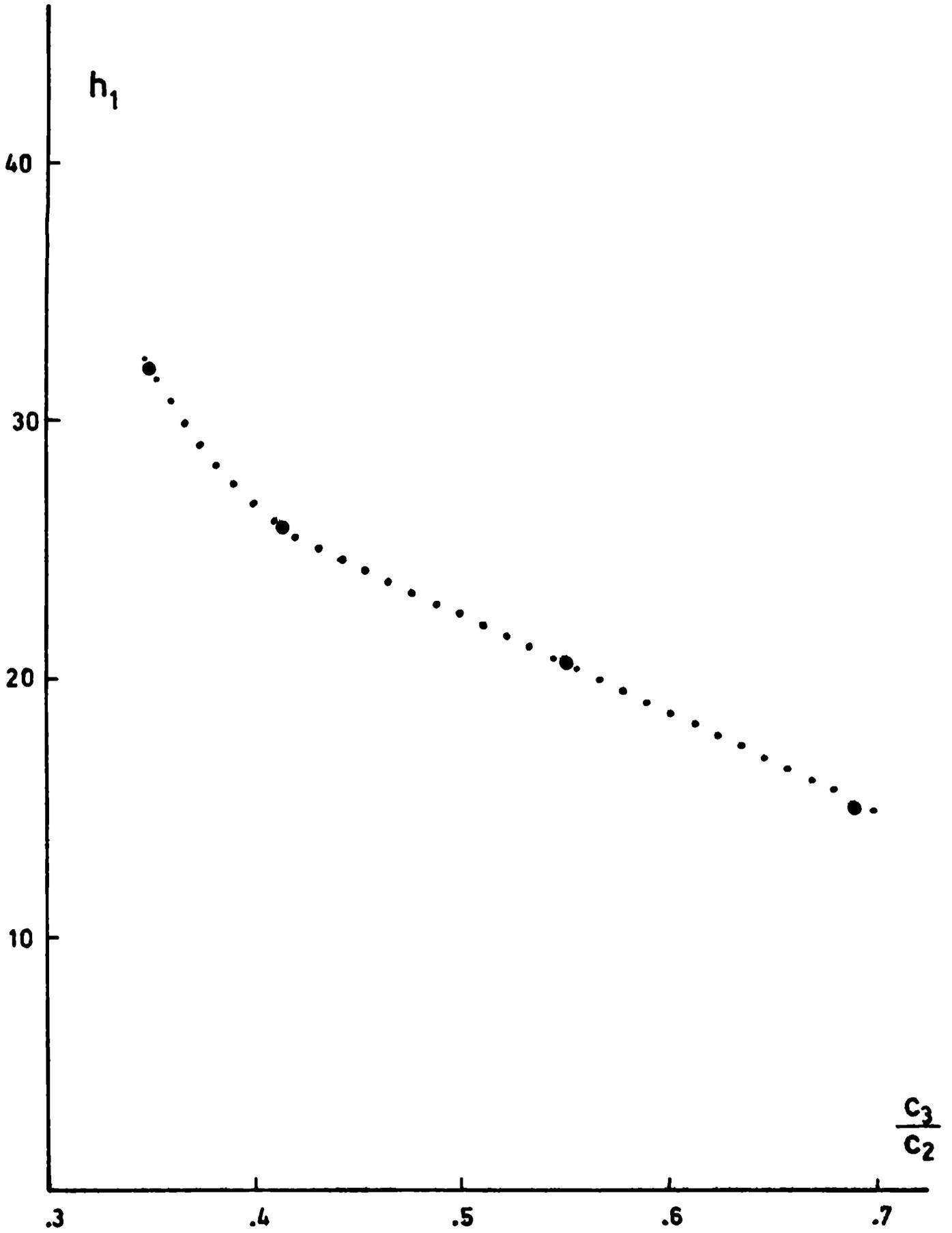


Fig 11: Resolución de mezclas de ^3H y ^{14}C mediante el método de relación de canales.

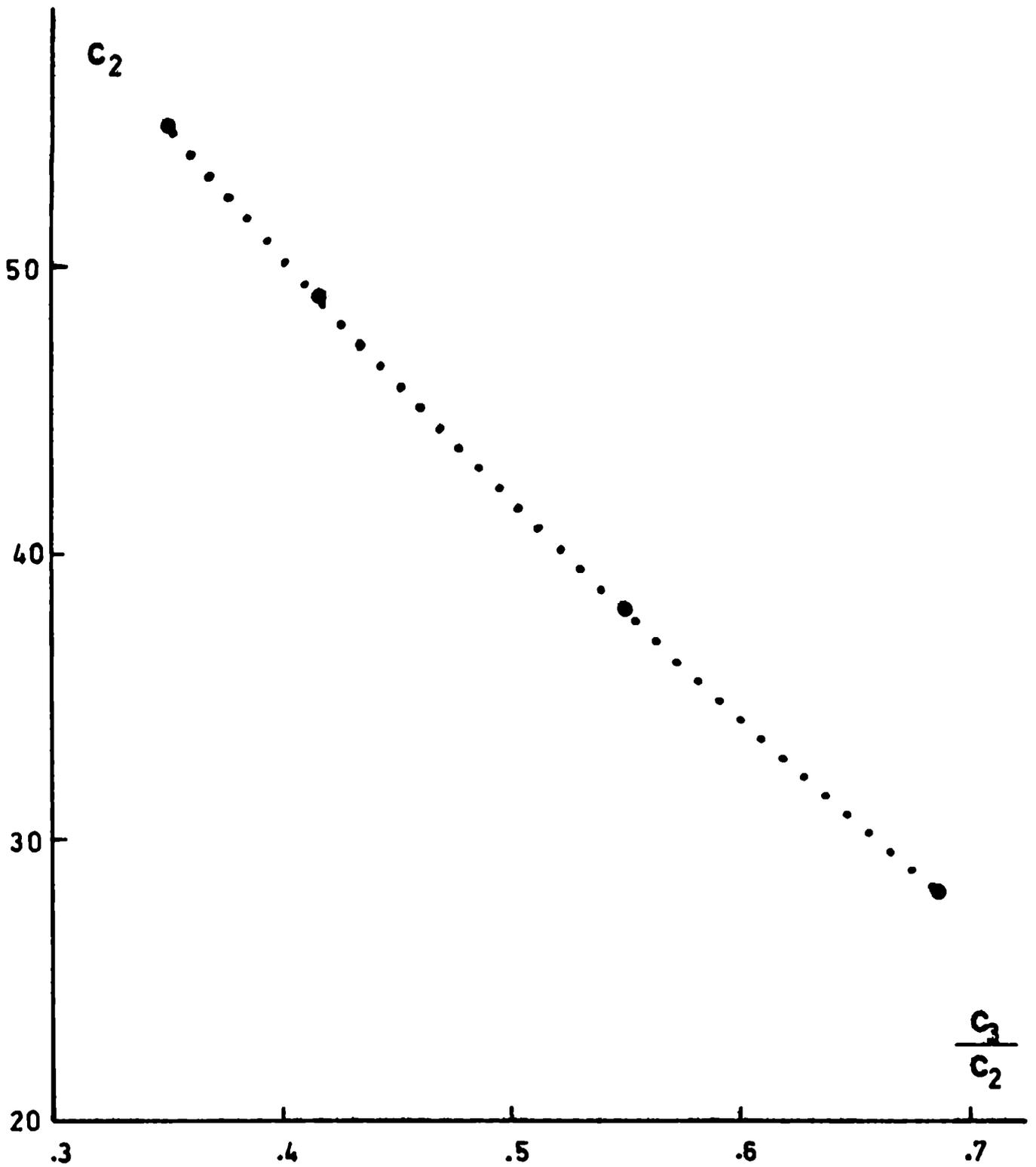


Fig 12: Resolución de mezclas de ^3H y ^{14}C mediante el método de relación de canales.

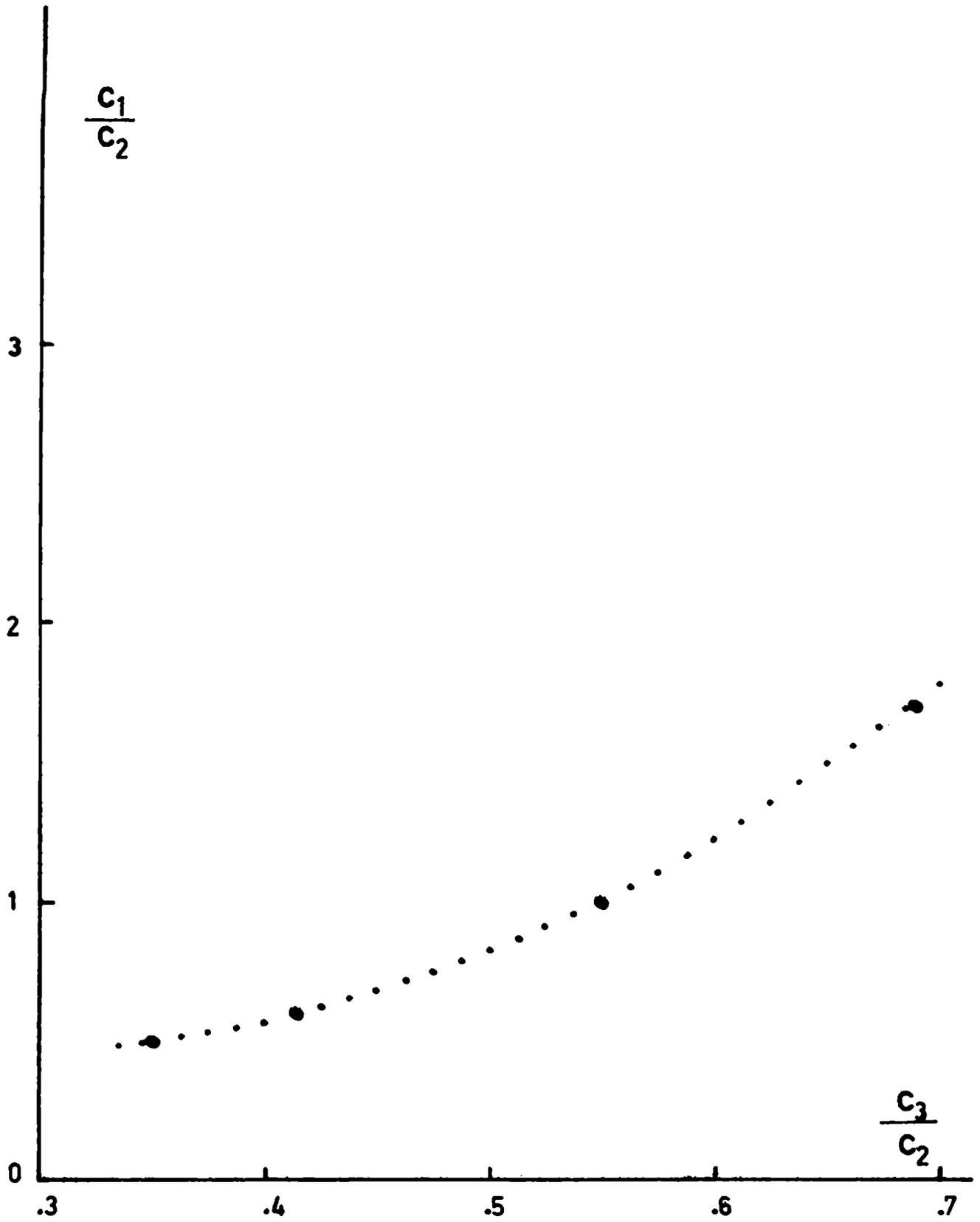


Fig.13: Resolución de mezclas de ^3H y ^{14}C mediante el método de relación de canales.

cada patrón medido en condiciones óptimas para ^{14}C y la eficiencia c_2 del mismo en un canal con parámetros óptimos para ^3H vs r.s.e. Para determinar la actividad absoluta de cada isótopo en una mezcla desconocida, se procedió en primer lugar a determinar el r.s.e. correspondiente y por interpolación en las 4 curvas descriptas se obtuvieron los valores de c_1 , h_2 , c_1/c_2 y h_1/h_2 . (fig 14 y 15). Con estos dos últimos y los datos de la actividad neta aparente de la muestra obtenida con parámetros óptimos para ^3H y ^{14}C en mediciones separadas, que llamamos N_2 y N_1 , se obtuvo la actividad absoluta de cada radioisótopo mediante las siguientes ecuaciones :

$$H = \frac{N_2 \cdot \frac{c_1}{c_2} - N_1}{h_2 \left(\frac{c_1}{c_2} - \frac{h_1}{h_2} \right)}$$

$$C = \frac{\frac{c_1}{c_2} \left(N_1 - \frac{h_1}{h_2} \cdot N_2 \right)}{c_1 \left(\frac{c_1}{c_2} - \frac{h_1}{h_2} \right)}$$

donde H corresponde a las dpm de ^3H y C a las de ^{14}C (249).

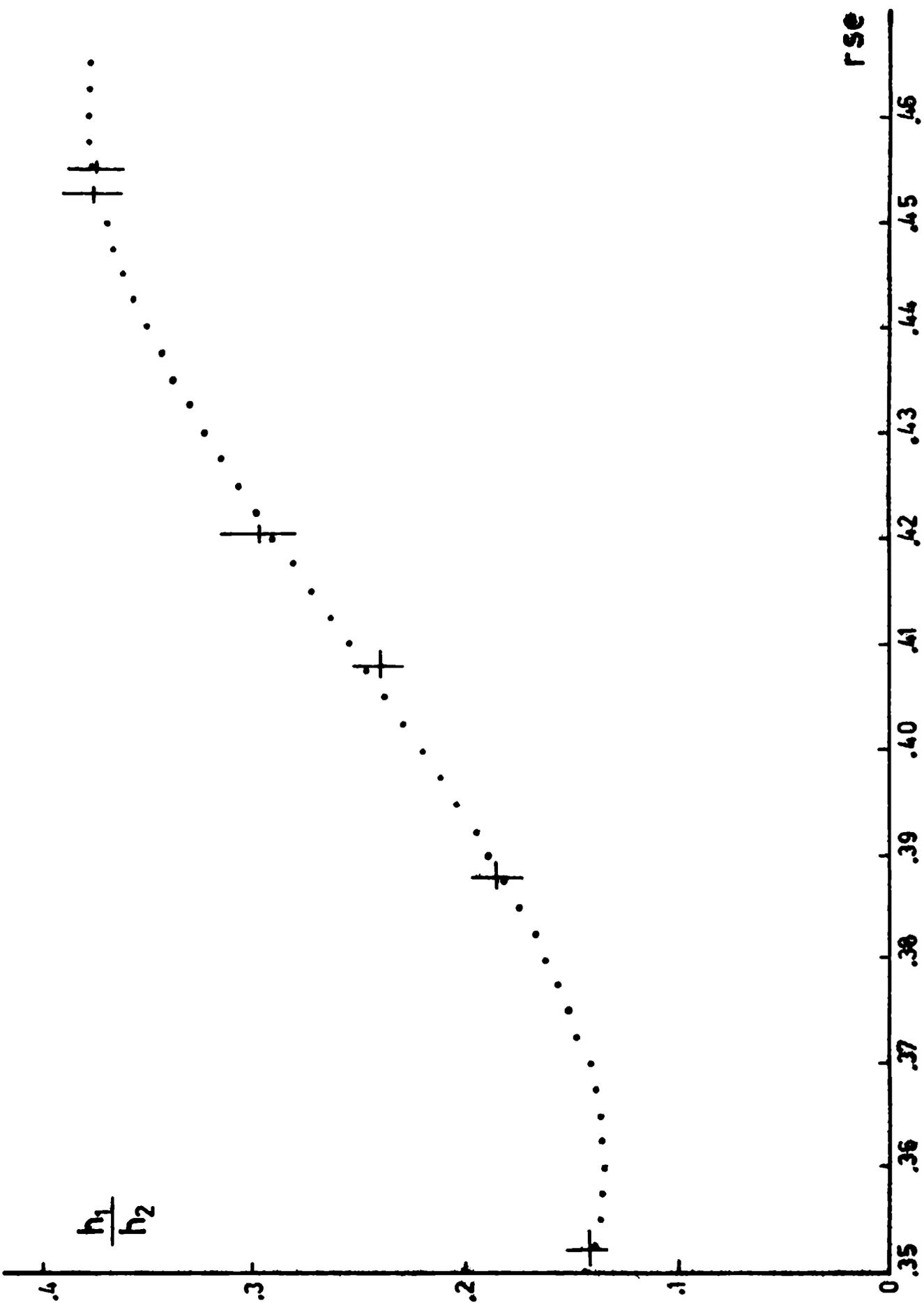


Fig.14: Resolución de mezclas de ^3H y ^{14}C utilizando standard externo

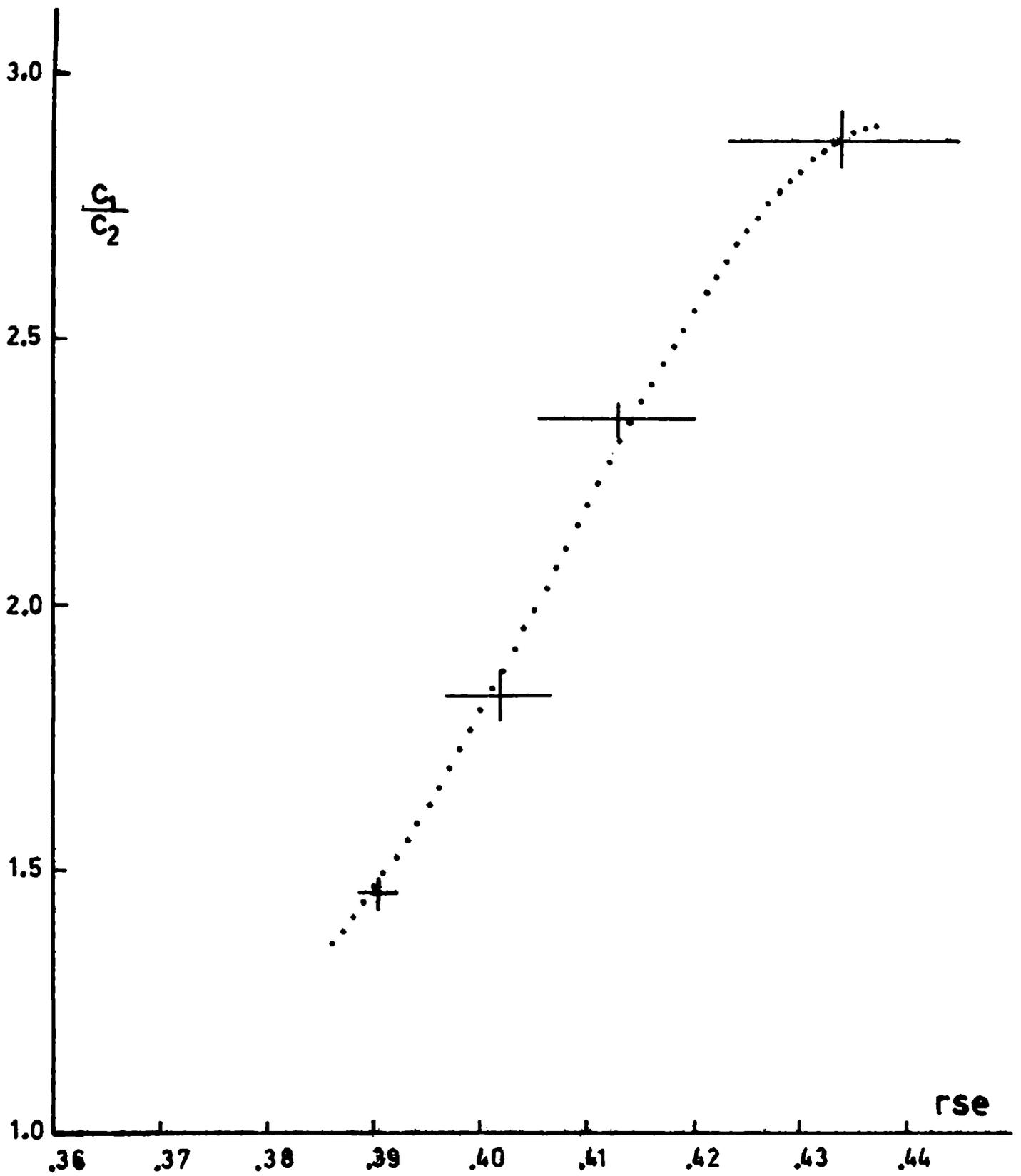


Fig.15: Resolución de mezclas de 3H y ^{14}C utilizando standard externo

F. Biosíntesis y aislamiento de 18 OH B

f.1 Purificación del precursor

1-2 $^3\text{H-B}$ ó 4- $^{14}\text{C-B}$ se purificaron por cromatografía en papel en el sistema TPG (230), previamente a ser utilizados como precursores de la 18 OH B.

f.2 Preparación del tejido

Se utilizaron ratas Wistar que pesaban entre 250-300 gramos. Los animales se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron las glándulas suprarrenales se les sacó la grasa y el tejido conectivo que las recubría y se cortaron en cuartos para formar distintos "pools" de acuerdo a Saffran y Shally (250).

Todas estas operaciones se realizaron entre 0-4 °C.

Se determinó luego el peso de cada "pool". Estos se preincubaron 3 veces durante 20 minutos cada vez con la mezcla de incubación , excepto el precursor y luego se procedió a incubar el tejido en presencia del precursor B, bajo las mismas condiciones.

f.3 Incubación

Las incubaciones se llevaron a cabo en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa(250-251).

Solución	sustancia	conc.	conc.	molaridad	relación
N°		%	M	final	
I	ClNa	0.9	0.154	0.118	25
II	ClK	1.15	0.154	0.0047	1
III	PO ₄ H ₂ K	2.11	0.154	0.0018	0.25
IV	SO ₄ Mg 7 H ₂ O	0.38	0.154	0.0018	0.25
V	CO ₃ HNa	1.29	0,154	0.0254	5.25
VI	Cl ₂ Ca	1.22	0.11	0.0254	0.75

dextrosa 0.01 M.

Para incubar se procedió de la manera siguiente:

i. Se colocaron en vasos de precipitados de 10 ml entre 1 y 2×10^6 dpm de $^3\text{H-B}$ en solución metanólica previamente purificada según se indicó. El solvente se evaporó hasta sequedad bajo N_2 .

i.i. Se agregó 1.63 ml de soluciones I a IV en la relación indicada.

i.i.i. Se añadió luego 0.16 ml de V (obtenida mezclando 47 mg de dextrosa en 2.1 ml de bicarbonato de sodio) obteniéndose la solución V*.

i.i.i.i. Se agregó 0.05 ml de VI.

i.i.i.i.i. Se agregaron los "pools" de adrenales.

Las incubaciones se realizaron bajo atmósfera de 95 % O_2 y 5 % CO_2 a pH= 7.4 en un baño tipo Dubnoff a 37°C con agitación.

Los tiempos de incubación oscilaron entre 30-120 minutos (190).

f.4 Extracción

Finalizada la incubación se procedió a aislar los productos previa adición al medio de incubación de aldosterona radioinerte y $4\text{-}^{14}\text{C}$ aldosterona como marcadores.

Se separó luego por decantación el sobrenadante y el tejido.

La fase acuosa se extrajo 3 veces con el doble de su volumen con Cl_2CH_2 , reuniéndose los extractos orgánicos.

El tejido se homogeneizó con alcohol etílico al 30 % en un potter de vidrio y el homogenato resultante se centrifugó en centrífuga clínica a 3000 rpm. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se extrajo 2 veces con el doble de su volumen con Cl_2CH_2 .

Se reunieron luego las 2 fases orgánicas provenientes del sobrenadante y tejido y se concentraron bajo atmósfera de N_2 en baño a 37°C para su posterior análisis cromatográfico.

Cuando se ensayó la 18 OH B en cualquiera de sus formas como precursor de la aldosterona, se utilizaron idénticas condiciones de incubación y extracción.

f.5 Separación e identificación de los compuestos

El extracto metilénico proveniente de la incubación se cromatografió en el sistema TPG (230).

Una vez desarrollado el cromatograma y localizados los distintos compuestos, se eluyó la zona más polar con metanol y se recromatografió en el sistema Bush B₅, lográndose así la separación de 18 OH B y aldosterona. Se eluyeron los compuestos y sobre alícuotas de cada uno de ellos se procedió a contar en el contador de centelleo líquido.

Los rendimientos de 18 OH B y aldosterona a partir de B fueron similares, con valores comprendidos entre 10 y 15 %.

G. Purificación de las 2 formas de 18 OH B: M y R_M4.33

Salvo que se aclare las formas de 18 OH B utilizadas en los ensayos se prepararon como se describirá a continuación. Por incubación a partir de ³H-B con cuartos de suprarrenales de rata sólo se obtuvo la forma más polar M; ésta se aisló mediante dos cromatografías en papel sucesivas en los sistemas TPG y Bush B₅. La forma más polar tiene en este último sistema un R_F 0.54 y la menos polar R_M 4.33 un R_F 2.05.

La forma más polar M así obtenida se estacionó en metanol a 31°C durante 10 a 15 días para obtener su transformación en la menos polar, R_M 4.33.

Al cabo de ese tiempo se procedió a separarlas por cromatografía en el sistema Bush B₅. El M remanente se volvió a estacionar en metanol nuevamente para obtener su transformación a R_M 4.33.

El R_M 4.33 obtenido se puso en contacto con agua destilada para obtener la forma más polar M nuevamente y ésta se reconvirtió en R_M 4.33 por estacionamiento en metanol como antes; la utilización de este material permitió asegurar que se trabajó con formas "interconvertibles". Esta última conversión M a R_M 4.33 no se realizó cuando se empleó M para la experiencia a llevar a cabo.

H. Caracterización de los distintos esteroides por preparación de derivados

h.1 Acetatos

Los acetatos de 18 OH B (formas M y R_M 4.33) se obtuvieron mediante tratamiento con anhídrido acético y piridina, analizándose los productos en el sistema cromatográfico Bush B₁, según la técnica de Raman y col (123).

En el caso de la aldosterona, se obtuvieron los acetatos (fundamentalmente el diacetato) mediante una técnica de acetilación análoga y los productos de reacción se separaron y caracterizaron por sus R_f por cromatografía en el sistema Cy-Di I, según Kliman y Peterson (232).

h.2 Lactonas

La 18 OH B fué sometida a dos diferentes técnicas de oxidación.

a) Por tratamiento con IO₄H 5 mM en SO₄H₂O.15 M durante 1 hora a temperatura ambiente y posterior detención de la reacción con Cl₂Sn al 6 % en ClH 0.1 N, según Wilson y col (252).

Los productos de reacción se analizaron en el sistema TPG.

b) Un tratamiento más enérgico, que también fué empleado para el diacetato de aldosterona, consiste en tratar el esteroide con CrO₃ al 0.5 % en acético glacial durante 10 minutos a temperatura ambiente, deteniéndose la reacción luego con etanol al 20 %.

Esta técnica, según Kliman y Peterson, produce la lactona del ácido 20 etienoico de 18 OH-11 dehidro B en el caso de la 18 OH B, y la 11-18 lactona del 21 monoacetato de aldosterona (LAMA) en el caso del diacetato de aldosterona.

Los productos de oxidación se separaron si provenían de 18 OH B, por cromatografía en TPG, mientras que cuando se partió del diacetato de aldosterona, la cromatografía se realizó en el sistema Cy-Bz.

I. Biosíntesis y aislamiento de 18 OH DOC

i.1 Purificación del precursor

4- ^{14}C -DOC se purificó por cromatografía en papel en el sistema Bush A antes de ser utilizado como precursor de la 18 OH DOC.

i.2 Preparación del tejido

Se procedió de la misma manera que la descrita para la obtención de 18 OH B.

i.3 Incubación y extracción

Las condiciones de incubación para la obtención de 18 OH DOC a partir de 4- ^{14}C -DOC fueron las mismas que las descritas para la obtención de 18 OH B variando sólo la cantidad del sustrato y el tiempo de incubación.

En cuanto a la extracción de los esteroides del medio de incubación se procedió de la manera antes mencionada.

i.4 Aislamiento de los compuestos

Los extractos en Cl_2CH_2 se llevaron casi a sequedad bajo una corriente de N_2 y se los tomó con un pequeño volumen de metanol para sembrarlos en las tiras de papel de cromatografía.

Las muestras fueron analizadas en el sistema TPG antes descrito. El tiempo de desarrollo fué aproximadamente de 7 horas, tal que todo el colorante rojo fuese recogido en los frasquitos de "overflow". La detección y elución se realizó de manera análoga a la descrita para 18 OH B.

J. Espectrometría de masa

Fundamento

La espectrometría de masa es una técnica que permite estudiar aspectos vinculados con la estructura molecular de numerosas sustancias. En muchos casos permite, con muy pequeñas cantidades de muestra

obtener valiosa información sobre ésta y bajo ciertas condiciones es posible incluso obtener el peso molecular exacto.

El método básicamente consiste en 1) producir iones de la sustancia en estudio y de fragmentos de ésta 2) separarlos según su relación masa / carga (m/e) 3) medición de la abundancia relativa de cada ión.

Los iones producidos son en su inmensa mayoría positivos siendo los negativos 10.000 veces menos abundantes que aquéllos.

Una vez introducida la muestra mediante uno de los varios sistemas posibles (253-256), es sometida a un proceso de producción de iones, también hay varios métodos, y a su aceleración mediante un campo eléctrico de alta tensión, llegándose comúnmente a velocidades del orden de los 300.000 Km / hora.

Los iones se enfocan adecuadamente en un haz. Este luego pasa al analizador de iones, donde mediante un campo magnético perpendicular a su trayectoria se separan precisamente según su m / e , desviándose más fácilmente aquéllos cuya relación es menor. Puede decirse que el 99.9 % de las especies iónicas producidas poseen carga unitaria, por lo cual la clasificación de dichos iones tiene lugar prácticamente según su masa.

Como todos los iones, llegan con igual energía al analizador de iones, la trayectoria única que permite la detección y registro de una corriente iónica en el colector de Faraday y sus equipos asociados implica en realidad una relación biunívoca entre el valor de campo magnético aplicado y la relación m / e .

Este modo de operar, o sea, variar el campo magnético dejando fijo el potencial de aceleración, es el más difundido, pues si bien es más lento que el que varía el campo eléctrico dejando el campo magnético constante (analizador electrostático) es más reproducible. En los estudios realizados se empleó el sistema de inserción directa de muestra. Este consiste en colocar la sustancia a analizar en un microcrisol de oro, que se inserta en la punta de una varilla, punta que es calentable mediante una resistencia y que una vez insertada llega hasta la propia cámara de ionización.

La muestra se evapora por lo tanto allí directamente lo que permite trabajar con muy pequeñas cantidades de muestra, incluso del orden de los 10 ug.

Es suficiente que a la temperatura de operación la presión de vapor de la muestra llegue a 10^{-5} torr, disminuyéndose así la probabilidad de descomposición térmica, puesto que se puede trabajar a menores temperaturas que con otros sistemas de inyección.

El equipo utilizado posee el sistema de producción de iones mediante bombardeo electrónico (" electron impact ").

La ionización se produce por interacción de un haz de electrones de intensidad y energía regulable, con las moléculas de la muestra vaporizada que atraviesan dicho haz, el efecto fundamental consiste en la pérdida de un electrón de la molécula y su fragmentación, lo cual produce iones con m/e característicos que son posteriormente analizados y detectados (253-256).

En general se trabaja con fuentes que alcanzan el rendimiento máximo de iones y una reproducibilidad óptima de los espectros, en la región de los 70 eV aproximadamente, donde la curva de rendimiento total medio de iones en función de la energía de los electrones llega a un máximo y adquiere forma horizontal, de modo que influyan poco pequeñas oscilaciones de tensión sobre el rendimiento iónico. Los espectros se realizaron en un espectrómetro de masa Varian - Mat CH 7, por impacto electrónico con equipo de inserción directa como se describió anteriormente.

j.1 Preparación de las muestras de 18 OH B

Compuesto M : En cada experiencia se preparó una solución que contenía 20×10^3 dpm de 18 OH B- 3H biosintetizada en el laboratorio como se describió y 100 ug de 18 OH B radioinerte en 100 ul de metanol destilado.

La solución resultante se sembró en forma puntual y se purificó mediante el sistema Bush B₅ (231).

El compuesto M se detectó, eluyó y concentró como se mencionó anteriormente, colocándose luego mediante una micropipeta en los microcrisoles de oro para su análisis por espectrometría de masa,

Una de las tiras del cromatograma se dejó sin sembrar para utilizarla como blanco de papel; con ella se procedió de manera análoga a la empleada con las muestras. Se incluyó además un standard de 18 OH B para comparar el esquema de fragmentación obtenido.

Compuesto R_M 4.33: Para cada ensayo, en un tubo con tapa a rosca se preparó una solución que contenía 40×10^3 dpm de 18 OH B- 3H y 120 ug de 18 OH B radioinerte en 5 ml de metanol destilado.

La preparación así obtenida, previo burbujeo con N_2 se cerró y dejó durante 10-15 días a $31^\circ C$ en un cuarto termostatzado para su transformación en R_M 4.33.

Al cabo de ese tiempo se evaporó hasta 100 ul bajo corriente de N_2 , se purificó por cromatografía y llevó a microcrisoles como se describió para el compuesto M.

Compuesto R_M^* 4.33: Cada determinación se realizó como sigue: en un tubo de 1 ml se colocaron 250 ul de una solución de 18 OH B- 3H (40×10^3 dpm) en agua y se le agregaron 100 ug de 18 OH B radioinerte evaporándose luego hasta sequedad bajo N_2 .

Al residuo seco se le agregaron 100 ul de una solución de ClH $10^{-2} N$ se homogeneizó y luego de 5 minutos se sembró en tiras de papel para separarlo en el mismo sistema cromatográfico y colocarlo en microcrisoles como ya se describió.

Todos estos estudios por espectrometría de masa se realizaron a 15 y 70 eV y 150 y $260^\circ C$ respectivamente.

j.2 Preparación de las muestras de 18 OH Progesterona

Las distintas formas de 18 OH Prog se purificaron por cromatografía en placa delgada en el sistema Heptano:acetato de etilo(3:1), identificándose en el texto siguiente cada compuesto según su R_f en ese sistema.

Compuesto I (R_f 0.10):

Se preparó una solución que contenía aproximadamente 60 ug de 18 OH Prog en 200 ul de metanol, se homogeneizó y se sembró en placas de 20x4 cm y 0.25 cm de espesor. Se desarrolló el cromatograma durante 1 hora.

La ubicación del compuesto se detectó por su absorción al UV.

La zona que absorbía se eluyó con metanol y se colocó en una microcápsula para determinar el espectro de masa.

Compuesto II (R_f 0.31):

Se preparó una solución que contenía entre 60-80 ug de 18 OH Prog (compuesto I) en 3 ml de metanol. Una vez disuelto el esteroide se burbujó N_2 y se lo mantuvo herméticamente cerrado en un cuarto a 31°C durante 20 días para su transformación en el compuesto II. Transcurrido ese tiempo se evaporó el solvente casi hasta sequedad y se lo sembró en placa delgada como se describió anteriormente.

Bajo estas condiciones se observó la presencia de 2 esteroides (compuestos I y II). Estos se eluyeron y los eluidos se colocaron en los microcrisoles para su análisis en el espectrómetro de masa.

Compuesto III (R_f 0.31) y Compuesto IV (R_f 0.37)

Se colocó en un tubo aproximadamente 80 ug de 18 OH Prog (compuesto I) y 200 ul de una solución de $ClH_{10}^{-2}N$. Se dejó reaccionar durante 5 minutos y se sembró en placa delgada.

Una vez desarrollado el cromatograma se detectaron 3 compuestos de R_f 0.10 (compuesto I), R_f 0.31 (compuesto III) y R_f 0.37 (compuesto IV).

Se eluyeron los compuestos en la forma habitual y se colocaron en los microcrisoles para su estudio.

Se incluyó además la preparación de un blanco de placa delgada. Todos estos espectros se realizaron a 20 y 70 eV y 150 y 260°C respectivamente.

j.3 Preparación de las muestras de 18 OH DOC

Las diferentes formas de 18 OH DOC se purificaron por cromatografía en el sistema TPG (230).

Compuesto X (R_f 0.16)

En cada ensayo se preparó una solución que contenía 15×10^3 dpm de 18 OH DOC biosintetizada en el laboratorio como se describió anteriormente y 80 ug de 18 OH DOC radioinerte en 200 ul de metanol. La solución resultante se sembró en forma puntual y se analizó en el sistema mencionado. Se obtuvo un sólo compuesto denominado X , la forma más polar de 18 OH DOC.

La elución se realizó en la forma habitual y se colocó en un microcrisol para determinar el espectro de masa.

Compuesto Y (R_f 0.70)

Para cada ensayo, se preparó una solución que contenía aproximadamente 30×10^3 dpm de 18 OH DOC- 3H y 120 ug de 18 OH DOC (compuesto X) radioinerte en 5 ml de metanol.

Una vez disuelto el esteroide se burbujeo N_2 y se lo cerró herméticamente manteniéndolo a 31 °C durante 20-25 días para su transformación en el compuesto Y.

Se llevó luego a sequedad bajo corriente de N_2 y se lo analizó en el sistema TPG.

La zona correspondiente al compuesto Y se eluyó y se colocó en los microcrisoles para determinar el espectro de masa.

Compuesto Z (R_f 0.96)

En cada ensayo se colocaron aproximadamente 35×10^3 dpm de 18 OH DOC- 3H y 150 ug de 18 OH DOC radioinerte (compuesto X) y se añadió 15 ul de tetrahidrofurano. A la solución resultante se le agregó 150 ul de ClH $10^{-2}N$, se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se analizó en el mismo sistema cromatigráfico. El compuesto Z obtenido se eluyó de la manera habitual y se colocó en un microcrisol para determinar su espectro de masa.

Se incluyó además la preparación de un blanco.

K. Estudios de estructuras mediante doble marcación isotópica

Para verificar los resultados obtenidos mediante espectrometría de masa se decidió investigar la reacción de $^3\text{H}_2\text{O}$ y $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ con dos formas de 18 OH B, respectivamente R_M 4.33 y M.

Para ello se hizo uso de las técnicas cromatográficas ya mencionadas y del análisis de doble isótopo por el método de la relación de canales o del Standard externo antes descriptos.

Ensayos con $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$:

k.1 Incorporación de $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$: Se diluyó isotópicamente una solución de 18 OH B- ^3H obtenida por biosíntesis en el laboratorio, con la cantidad de 18 OH B radioinerte necesaria para obtener una preparación de actividad específica comparable a la del $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$.

La preparación del esteroide, que estaba en su forma más polar M, se puso en contacto con $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ obteniéndose su transformación parcial en la forma menos polar R_M 4.33.

Al cabo del tiempo necesario para producir una interconversión apreciable, las muestras se sembraron en tiras de papel y se analizaron por cromatografía en el sistema Bush B₅. La ubicación de los compuestos se realizó como se mencionó anteriormente. Una vez eluidos éstos, se procedió a determinar sobre alícuotas la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ por los métodos antes mencionados.

k.2 Estudio de la transformación inversa en H_2O :

Por ensayos previos se sabía que la forma menos polar, R_M 4.33, en contacto con agua se transformaba en la más polar M.

Así se decidió investigar qué ocurría con la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ cuando R_M 4.33 obtenida a partir de $^3\text{H-M}$ y $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ se transformaba en M. Para ello la solución metanólica de la forma R_M 4.33 se llevó a sequedad bajo N_2 ; al residuo seco del esteroide se le agregó inmediatamente agua destilada y se dejó a 31°C durante aproximadamente 1 semana para su transformación en M.

El análisis fué similar al descrito en el ensayo de incorporación de $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$, determinándose en este caso la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ en la única forma obtenida, M.

Ensayos con $^3\text{H}_2\text{O}$

k.3 Incorporación de $^3\text{H}_2\text{O}$: En este caso fué necesario biosintetizar 18 OH B- ^{14}C por las técnicas habituales.

Una vez aislada y purificada se la diluyó con 18 OH B. radioinerte para obtener una preparación con actividad específica comparable a la del $^3\text{H}_2\text{O}$.

Las muestras ya diluidas se pusieron en contacto con metanol radioinerte para obtener una transformación apreciable en la forma menos polar R_M 4.33.

Transcurrido el tiempo necesario para tal transformación (15 días aproximadamente) se analizaron en el sistema Bush B_5 .

Una vez identificadas en el cromatograma las dos formas correspondientes se cortó la zona del papel donde se hallaba presente R_M 4.33 y se la puso en contacto con $^3\text{H}_2\text{O}$ durante 1 semana a 31 °C.

El producto de la reacción fué analizado en el sistema Bush B_5 antes mencionado obteniéndose un único compuesto M, el cual se eluyó del modo habitual.

Sobre una alícuota de los eluidos se determinó por medio de un contador de centelleo líquido la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ como se mencionó anteriormente.

k.4 Estudio de la transformación inversa en CH_3OH :

El resto de la preparación M eluida, proveniente de R_M 4.33- ^{14}C y $^3\text{H}_2\text{O}$, se dejó en solución de metanol radioinerte para su transformación en la forma menos polar nuevamente; el análisis de los productos de reacción dió dos formas M y R_M 4.33 en el mismo sistema cromatográfico, donde una vez eluidos éstos se procedió a determinar la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ de ambos compuestos.

RESULTADOS

I. Condiciones de trabajo y estabilidad de los compuestos

Como se expresó, si bien era conocido que la 18 OH B sufre transformaciones - así como otros esteroides 18 hidroxilados - (142,145) por acción de diferentes medios, no se conocía la naturaleza de los productos formados ni tampoco la de tales transformaciones.

Por ello, habiéndolo obtenido mediante biosíntesis y posterior purificación del esteroide radioactivo a partir de B con rendimientos que oscilaron entre el 10 y el 15 %, y teniendo certidumbre de la pureza del material así preparado por caracterización de tal preparación por su movilidad cromatográfica y la de sus derivados (acetatos, lactonas) obtenidos a partir del mismo, se procedió a estudiar la naturaleza de algunas de las llamadas formas de distinta polaridad (M, R_M 4.33 y R_M^* 4.33) y ciertas características de las transformaciones en tales formas, a saber, influencia de la naturaleza de los medios que ocasionan esas conversiones, y curso de las reacciones en el tiempo.

Fué necesario evidentemente no sólo disponer de las distintas "formas" aisladas, sino también hallar condiciones bajo las cuales éstas se mantuvieran estables.

La forma M no se altera en estado sólido ni en soluciones acuosas. La forma R_M 4.33 de 18 OH B había sido mencionada en trabajos anteriores (145) donde se describía que en " residuo seco " se convertía completamente en M en 7 días y se le adjudicaba la posible estructura de " dímero", análogamente a lo propuesto por Dominguez para 18 OH DOC (142).

Basándonos en tal hipótesis pero teniendo en cuenta que según Levy y col (127) la estructura no sería exactamente un dímero, sino un producto de condensación con pérdida de agua, ensayamos la estabilidad de R_M 4.33 en condiciones absolutamente anhidras, en un desecador al vacío y sobre Na metálico.

En tales condiciones R_M 4.33 no sufrió alteración alguna durante el tiempo ensayado (30 días).

Además el hecho de que $R_M 4.33$ se convirtiera rápidamente en M en presencia de agua, hallazgo realizado también en el presente trabajo, apoyó la idea que esta transformación requiere precisamente agua. Esto fué confirmado definitivamente mediante ensayos con 3H_2O como se describe más adelante, aunque la estructura propuesta para $R_M 4.33$ no es un producto de condensación de dos moléculas de esteroide, del tipo sugerido originalmente por Levy y col (127) para el homólogo 18 OH DOC.

En cuanto a $R_M^* 4.33$, no pudo detectarse alteración alguna durante 30 días en estado sólido, ni se halló apreciable transformación de la misma en contacto con agua a 31 °C durante 15 días.

II. Caracterización de los distintos esteroides por formación de derivados

II.a Formación de acetatos

Sobre alícuotas convenientes de las formas de 18 OH B, M y $R_M 4.33$ y de aldosterona provenientes de la incubación se realizó acetilación según Kliman y Peterson (232).

Se acetilaron además " standards " de 18 OH B radioinerte así como de aldosterona radioinerte y 4-¹⁴C aldosterona.

Los compuestos que estaban en metanol fueron evaporados previamente bajo una corriente de N_2 . Al residuo seco del esteroide se le agregaron iguales volúmenes de piridina y anhídrido acético.

Se dejó proceder la reacción durante 24 horas a 27°C en tubos tapados herméticamente; al cabo de este lapso la reacción se detuvo por la adición de metanol y se evaporó totalmente mediante una corriente de aire.

Los residuos secos se disolvieron en un pequeño volumen de metanol y se sembraron en papel.

Los acetatos de ambas formas de 18 OH B se analizaron por cromatografía en el sistema Bush B₁ obteniéndose un $R_f=0.58$ en los dos casos que coincide con el valor para el acetato de 18 OH B encontrado por Raman (125).

Los acetatos de aldosterona se analizaron en el sistema "Cy-Di I" obteniéndose un $R_f=0.68$.

II.b Formación de lactonas

La oxidación de 18 OH B se llevó a cabo por dos métodos distintos.

II.b₁ Oxidación según Wilson (252)

El esteroide que estaba en metanol se llevó a sequedad bajo N_2 . Al residuo seco del esteroide se le agregó una solución de IO_4H 0.005 M en SO_4H_2 0.15 M. Se agitó y se dejó proceder la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se le agregó una solución de Cl_2Sn al 6 % en ClH 0.1 M y se agitó.

La solución de aspecto lechoso se extrajo con Cl_2CH_2 y se cromatógrafió en el sistema TPG.

El mismo procedimiento se realizó con un standard de 18 OH B radioinerte obteniéndose la lactona del ácido 20 etienoico de 18 OH B que en este sistema cromatográfico tiene un $R_B=1.1$ (118).

II.b₂ Oxidación crómica (Kliman y Peterson) (232)

Esta técnica fué empleada tanto para la 18 OH B como para el acetato de aldosterona.

Los esteroides que estaban en metanol se llevaron a sequedad bajo una corriente de N_2 . Al residuo seco del esteroide se le agregó Cr_2O_3 al 0.5 % en acético glacial.

Una vez homogeneizados los tubos se dejó proceder la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Al cabo de ese tiempo se agregó alcohol etílico al 20 % en agua y Cl_2CH_2 . Se agitó y se descartó la fracción acuosa.

El extracto metilénico se lavó con agua destilada y se evaporó el solvente bajo aire.

Se realizó el mismo procedimiento con standards de 18 OH B radioinerte y acetato de aldosterona radioinerte así como con 4-¹⁴C acetato de aldosterona.

La lactona del ácido etienoico de 18 OH 11 dehidrocorticosterona se analizó por cromatografía en el sistema TPG obteniéndose un $R_B=2.25$ (133).

El producto obtenido a partir de aldosterona, lactona del acetato de aldosterona fué analizada en el sistema Cy-Bz obteniéndose un $R_F=0.25$ (257). Los resultados se resumen en la tabla I.

Tabla: I Caracterización de LICH B

Tratamiento	Compuesto	Sistema	R_x
-	M R_M 4, 33	Bush B ₅	$R_F = 0.54$ $R_F = 2.05$
IO_4H	M: 18-20 lactona de M R_M 4, 33: 18-20 lactona de R_M 4.33	TP 6	$R_B = 1.1$ $R_B = 1.1$
Cr_2O_3	M 10-20 lactona de M R_M 4.33 18-20 lactona de R_M 4.33	TP 6	$R_B = 2.25$ $R_B = 2.25$
$(CH_3CO)_2O$ C_2H_5N	M Acetato de M R_M 4.33 Acetato de R_M 4.33	Bush B ₁	$R_F = 0.58$ $R_F = 0.58$

III. Curso de reacción en medio acuoso

Se trabajó con ^3H -18 OH B obtenida por biosíntesis y convertida parcialmente en $R_M4.33$ como se describió en materiales y métodos. La solución de $R_M4.33$ se llevó a volumen y se tomó una alícuota del 2 % para determinar su actividad en un contador de centelleo líquido.

Luego se tomaron aproximadamente 3×10^6 dpm y se colocaron en un vaso de precipitado evaporando hasta sequedad bajo N_2 .

Al residuo seco se le agregó agua destilada, se homogeneizó y se colocó en un baño termostatzado a 31 °C.

A distintos tiempos se tomaron alícuotas de aproximadamente 5×10^5 dpm y se analizaron en el sistema Bush B₅.

La posición de las formas de 18 OH B se localizó por pasaje a través de un radiocromatógrafo. Las zonas radiactivas en cada cromatograma fueron eluidas como se mencionó anteriormente y llevadas a volumen.

Se tomaron alícuotas de 5-10 % de cada fracción, según su actividad, y se las midió en un contador de centelleo líquido.

La figura 16 muestra el curso de la reacción de conversión de $R_M4.33$ a M en medio acuoso a 31 °C.

IV. Estudio de la transformación de M a $R_M4.33$ en medios alcohólicos

Trabajos anteriores sobre esteroides 18 hidroxilados, como 18 OH DOC (142) y 18 OH B (145) describían que estos esteroides podían convertirse en formas menos polares por estacionamiento en metanol y otros solventes.

Debido a la falta de un estudio sistemático de las transformaciones obtenidas en metanol, se estudió el curso de reacción de este proceso. Además se decidió investigar también tales conversiones con mayor detalle en otros alcoholes como etanol y butanol.

Para ello volúmenes iguales de solución en Cl_2CH_2 de esteroide tritizado (aproximadamente 2×10^5 dpm) se llevaron a residuo seco evaporando con N_2 ; se agregó 100 ul de agua destilada a cada uno para mantener el esteroide bajo la forma más polar M.

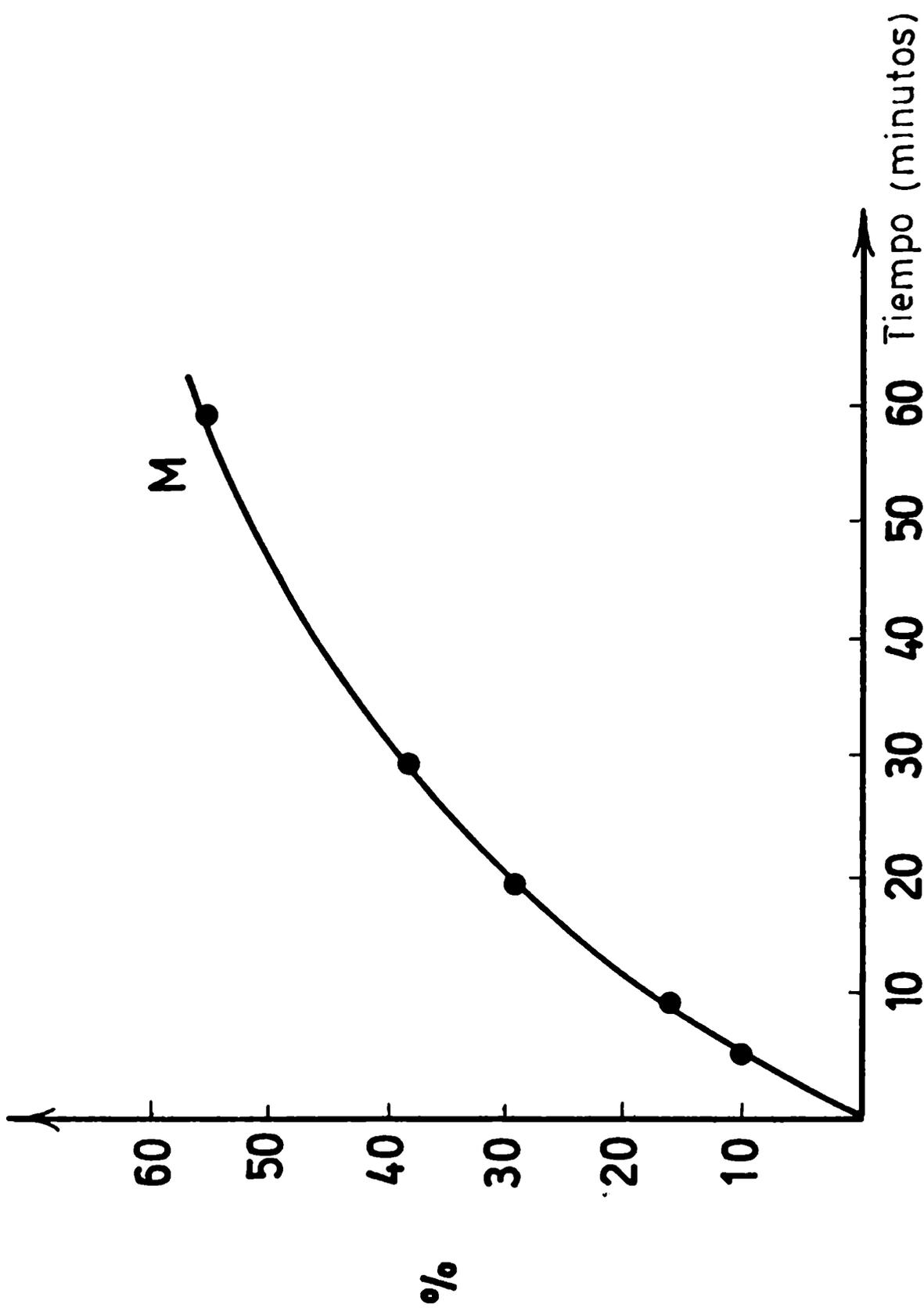


Fig. 16 : Curso de reacción de formación de 18 OH B M a partir de R_M 4.33 en agua a 31°C.

Para estudiar las conversiones en metanol, etanol y butanol neutros se realizaron 3 series de ensayos. A cada serie de tubos se le agregó 1 ml del alcohol correspondiente.

Se tomó a "tiempo cero" una alícuota para ser analizada en el sistema Bush B₅. El resto de los tubos fueron tapados y colocados a 31 °C.

A distintos tiempos se tomaron muestras y se analizaron en el mismo sistema.

La presencia de las formas de 18 OH B fué detectada mediante un radiocromatógrafo.

Las zonas radiactivas fueron eluidas del papel en la forma habitual y se tomaron alícuotas del 10 % para determinar su actividad.

El curso de la reacción fué estudiado hasta los 8 días.

La figura 17 muestra la conversión de M en R_M 4.33 en metanol.

Ninguno de los otros dos alcoholes neutros fué capaz de transformar M en el tiempo estudiado en un compuesto de menor polaridad.

Roy y col (148) publicaron resultados acerca del comportamiento de 18 OH DOC, estando ya muy avanzado el presente trabajo sobre 18 OH B; tales resultados concordarían con los nuestros, pues hallan una mayor reactividad de metanol que de etanol.

V. Transformaciones en medios acidificados, acuosos y alcohólicos

En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la naturaleza protogénica del metanol per se así como la posible influencia de una catálisis ácida en este tipo de reacciones se decidió estudiar estas conversiones en medios acuosos y alcohólicos acidificados. Roy y col (148) encontraron también que este tipo de reacciones era acelerada por el agregado de trazas de ácido.

Por otra parte Levy y col (127) en sus estudios sobre 18 OH DOC demostraron transformaciones a productos no polares en medios acuosos acidificados.

Estudios anteriores nuestros indicaban que a una concentración de ClH acuoso 10^{-2} N aparecía también un compuesto con R_M 4.33, que designamos R_M* 4.33, aún en ausencia de alcoholes y que el rendimiento de tal conversión era óptimo en esa concentración de ácido. A con-

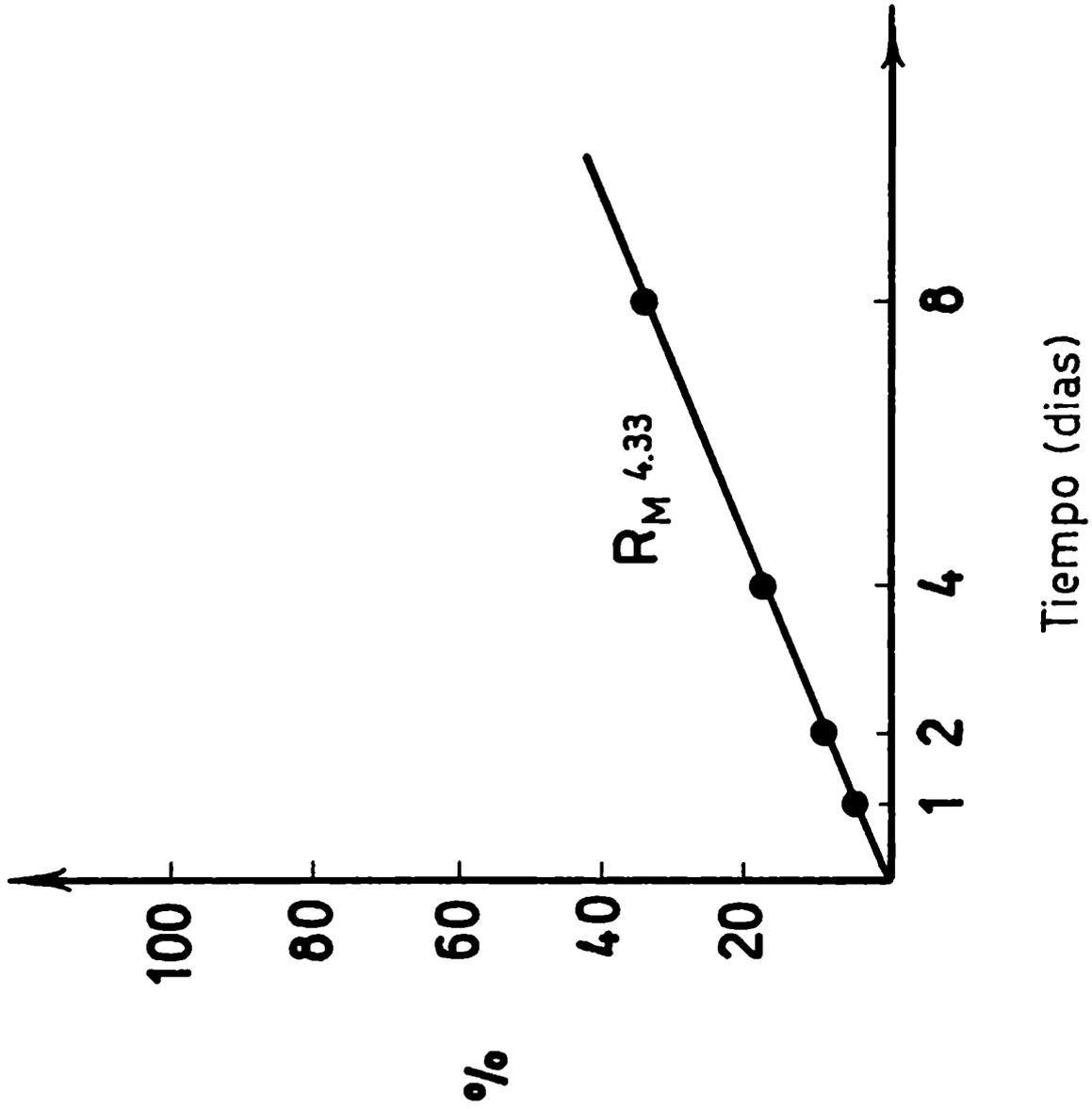


Fig. 17 : Curso de reacción de formación de $R_M 4.33$ a partir de 18 OH B M en CH_3OH a $31^{\circ}C$.

centraciones menores la formación de R_M^* 4.33 disminuía y a concentraciones mayores también, pero en este caso aparecían otras formas de menor polaridad.

Decidimos estudiar todas las transformaciones a esa concentración de ácido como primera aproximación al problema.

Para realizar estos estudios se procedió de la siguiente manera, Se prepararon soluciones 10^{-2} M en ClH en agua, metanol, etanol y butanol.

En cuanto al esteroide se partió de una preparación de 18 OH B-³H en forma M (solución acuosa). De ésta se tomaron alícuotas de 100 ul (150.000 dpm) que fueron colocadas en tubos de 5 ml con tapa esmerilada.

Se realizaron separadamente 4 series de ensayos para investigar las transformaciones en los cuatro medios descriptos. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

El esteroide en los tubos fué llevado a sequedad en un desecador al vacío.

Al residuo seco se agregó 250 ul de la solución correspondiente. Los tubos fueron homogeneizados por agitación y se procedió a sembrar una primera alícuota de 20 ul de cada uno a los 30 minutos. Luego los tubos fueron puestos a 31°C para estudiar el curso de reacción tomándose alícuotas de 20 ul al cabo de 1, 2, 4 y 8 días. Los cromatogramas fueron desarrollados en el sistema Bush B₅ y examinados mediante un radiocromatógrafo.

La proporción relativa de cada una de las formas obtenidas bajo estas condiciones fué evaluada por integración de las áreas bajo cada pico del trazado del radiocromatógrafo.

Las figuras 18, 19, 20 y 21 muestran los resultados obtenidos.

Como puede observarse los resultados obtenidos con tales medios fueron muy diferentes a los encontrados sin adición de ClH.

Si bien el etanol y butanol neutros no fueron capaces, dentro del intervalo de tiempo estudiado, de producir modificaciones detectables de la forma más polar M, en presencia de ácido se observa en ambos casos la aparición de 5 compuestos de diferente polaridad.

En cuanto al comportamiento en metanol también hubo modificaciones.

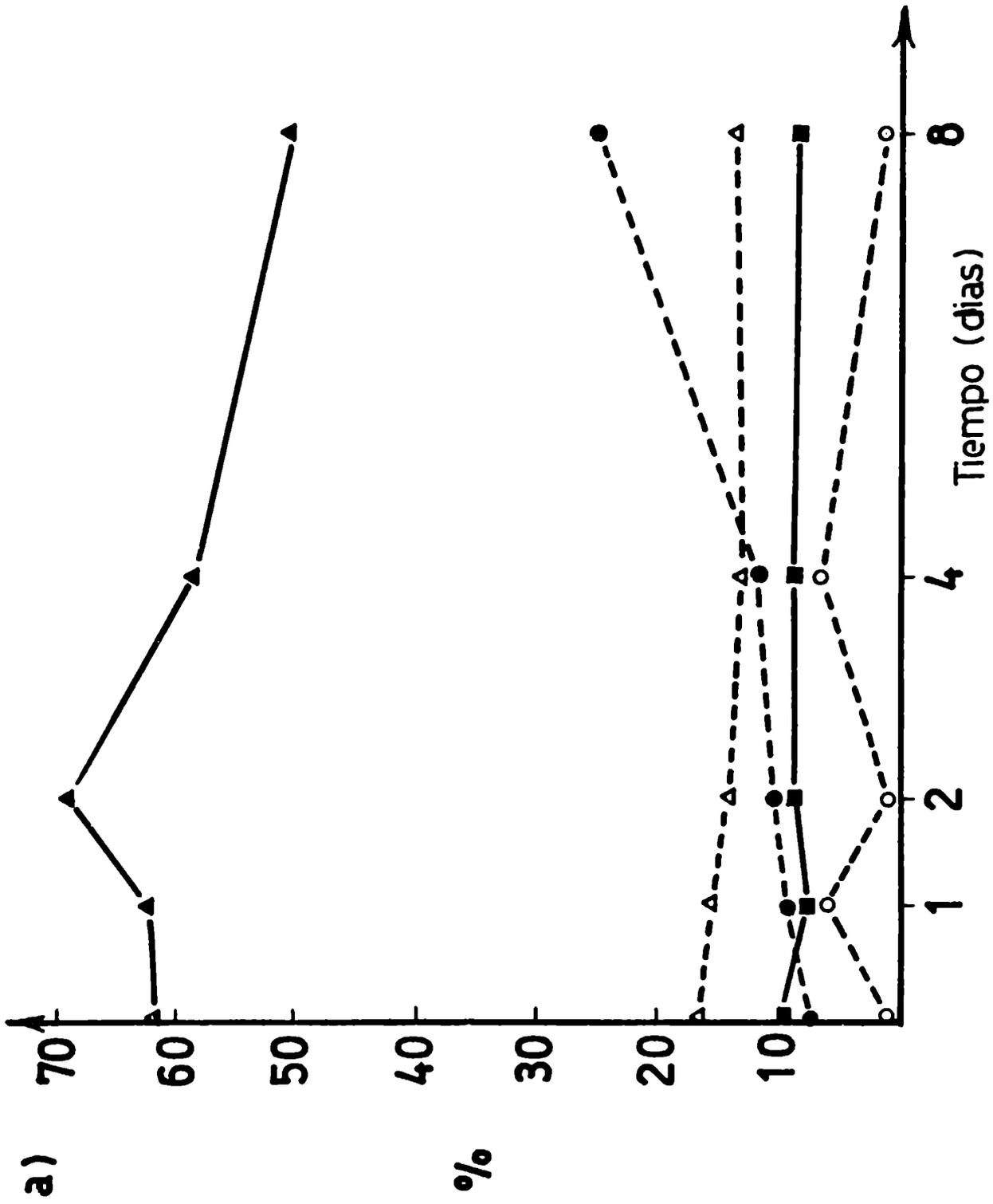


Fig. 18 : Curso de reacción de formación a partir de 18 OH B M en solución acuosa de ClH 10^{-2} N a 31°C de:
M, ▲ R_M^* 4.33, △ R_M 5.26, ● R_M 6.34, ○ R_M 7.18.

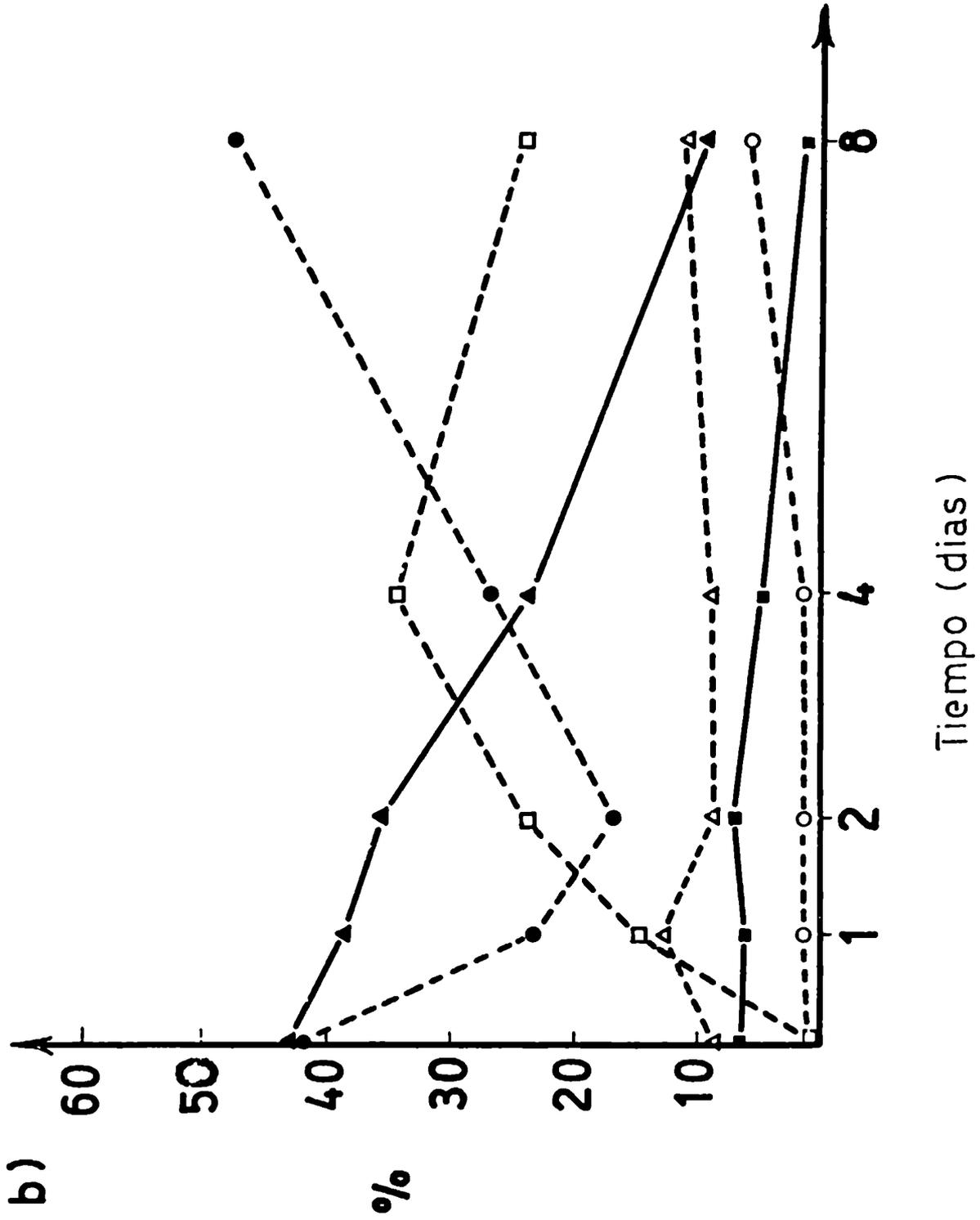


Fig. 19 : Curso de reacción de formación a partir de 18 OH B M en solución metanólica de $ClH 10^{-2} N$ a $31^{\circ}C$ de:
 \blacksquare R_M 1.84, \bullet R_M 4.33, \square R_M 5.26, \triangle R_M 6.34, \circ R_M 7.18.

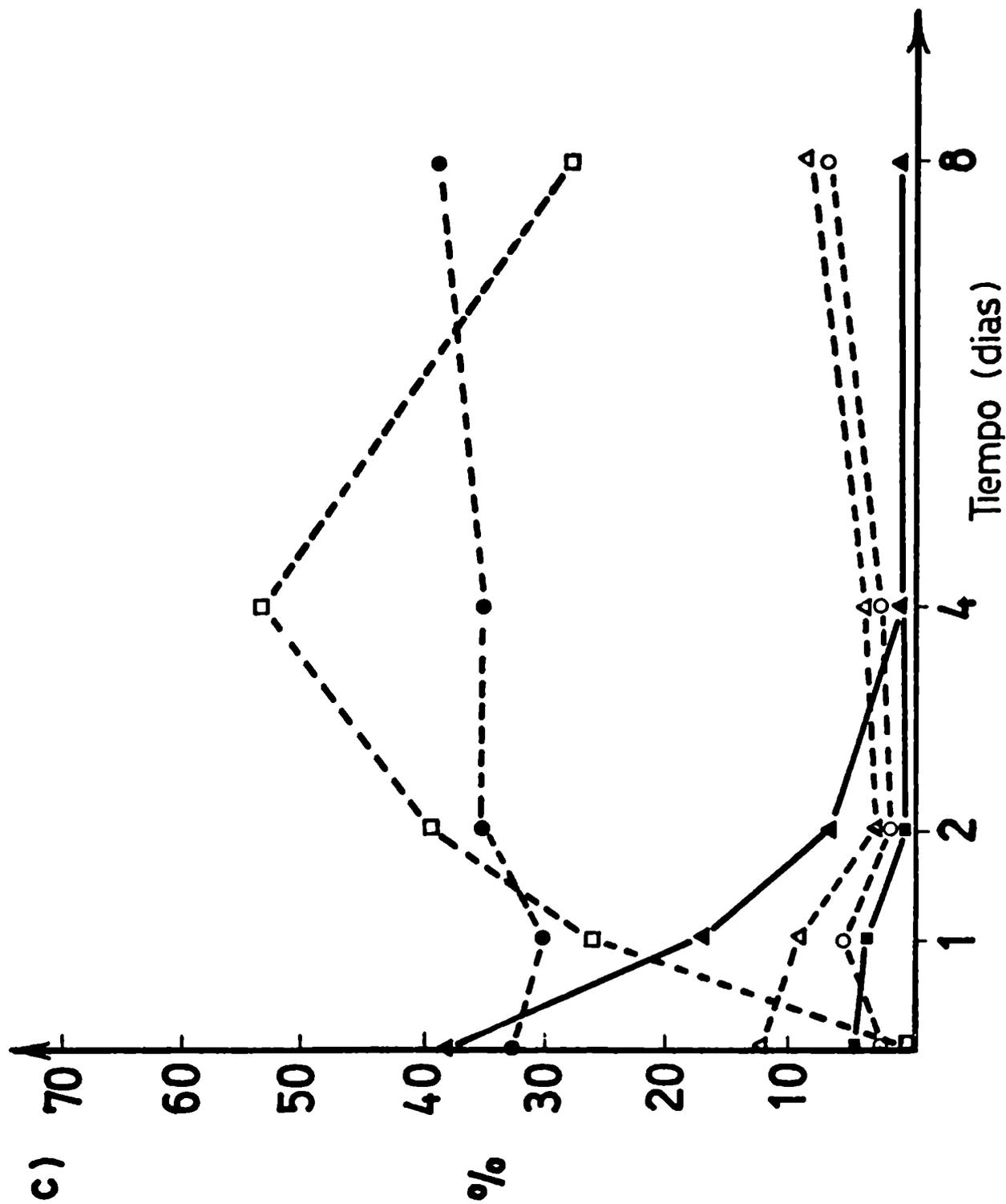


Fig. 20: Curso de reacción de formación a partir de 18 OH B M en solución etanólica de ClH 10^{-2} N a 31°C de:
■ R_M 1.84, ▲ R_M 4.33, △ R_M 5.26, □ R_M 6.34, ○ R_M 7, 18.

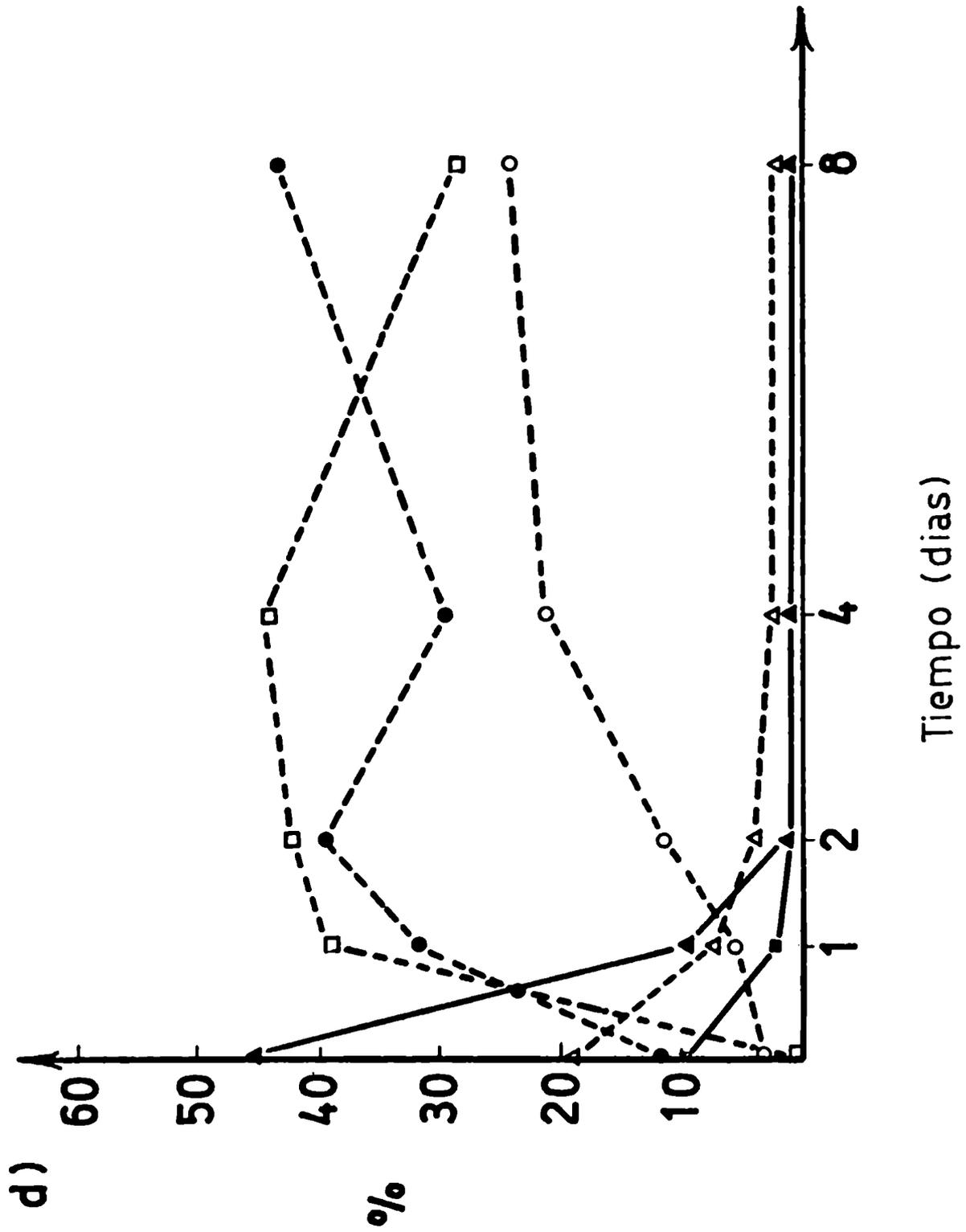


Fig. 21 : Curso de reacción de formación a partir de 18 OH B M en solución butanólica de ClH 10⁻² N a 31°C de:
■ M, □ R_M 1.84, ▲ R_M 4.33, △ R_M 5.26, R_M 6.34, ○ R_M 7.18.

Por estacionamiento en metanol neutro la forma más polar M da un único compuesto caracterizado como R_M 4.33 cuyo curso de reacción ya fué descrito. La adición de ácido a este alcohol produce también la aparición de 5 formas de diferente polaridad en el sistema cromatográfico empleado.

Como se mencionó, el tratamiento con soluciones acuosas de ClH produce conversiones a formas de menor polaridad.

Todas estas formas fueron caracterizadas por su R_M obteniéndose los siguientes valores: R_M 1.84, R_M 4.33, R_M 5.26, R_M 6.34 y R_M 7.18.

El número de formas menos polares obtenidas bajo estas condiciones experimentales es análogo en los cuatro medios, si bien el compuesto denominado R_M 1.84, uno de los más abundantes en los medios alcohólicos, nunca pudo detectarse en presencia de ClH acuoso.

Además el compuesto R_M 6.34 es mucho más abundante en los medios alcohólicos acidificados que en ClH acuoso.

En las figuras 19, 20 y 21 puede verse que el curso de la reacción en todos los medios alcohólicos acidificados es análogo, aunque la velocidad de desaparición del compuesto R_M 4.33 aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada, dicho compuesto ó compuestos deben formarse muy rápidamente, puesto que ya a los 30 minutos se lo detecta en cantidades muy significativas.

VI. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA POR ESPECTROMETRIA DE MASA

Salvo que se aclare los espectros fueron realizados a 150 y 260°C y 15 y 70 eV y se corrieron hasta $m/e = 750$.

Básicamente se obtuvieron los mismos esquemas de fragmentación bajo las diferentes condiciones, salvo diferencias en las intensidades relativas.

VI.a Estudios con 18 OH B

Espectro de masa del compuesto M

La forma más polar M da un ión molecular a $m/e = 362$. A $m/e = 345$ se observa un pico que puede atribuirse a la pérdida de un grupo OH unido a C-11 ó más probablemente a C-20 de la estructura hemiacetálica.

El pico a $m/e = 315$ puede atribuirse a la pérdida de un fragmento neutro de 30 um, HCHO en C-21, a partir del ión $m/e = 345$.

Una nueva pérdida de CHOH en C-18 originaría el pico base a $m/e = 285$, ó alternativamente, una pérdida de 18 um, H₂O, del ión $m/e = 215$ puede originar el pico $m/e = 297$; tal pérdida puede provenir del OH en C-20 ó en C-11, según la estructura del $m/e = 345$ que lo origina.

El pico base, perdiendo un fragmento más de HCHO en C-20 originaría el ión $m/e = 255$.

El espectro de masa del compuesto M, que es idéntico al de 18 OH B standard, se muestra en la figura 22.

Espectro de masa del compuesto R_M 4.33

La forma menos polar obtenida por estacionamiento en metanol presenta un pico a $m/e = 376$, atribuible al ión molecular cuya estructura corresponde a un metoxiderivado en C-20.

La pérdida de 31 um daría cuenta del pico a $m/e = 345$ que puede atribuírse o bien a la pérdida de un grupo CH₂OH ó un OCH₃, unidos ambos a C-20.

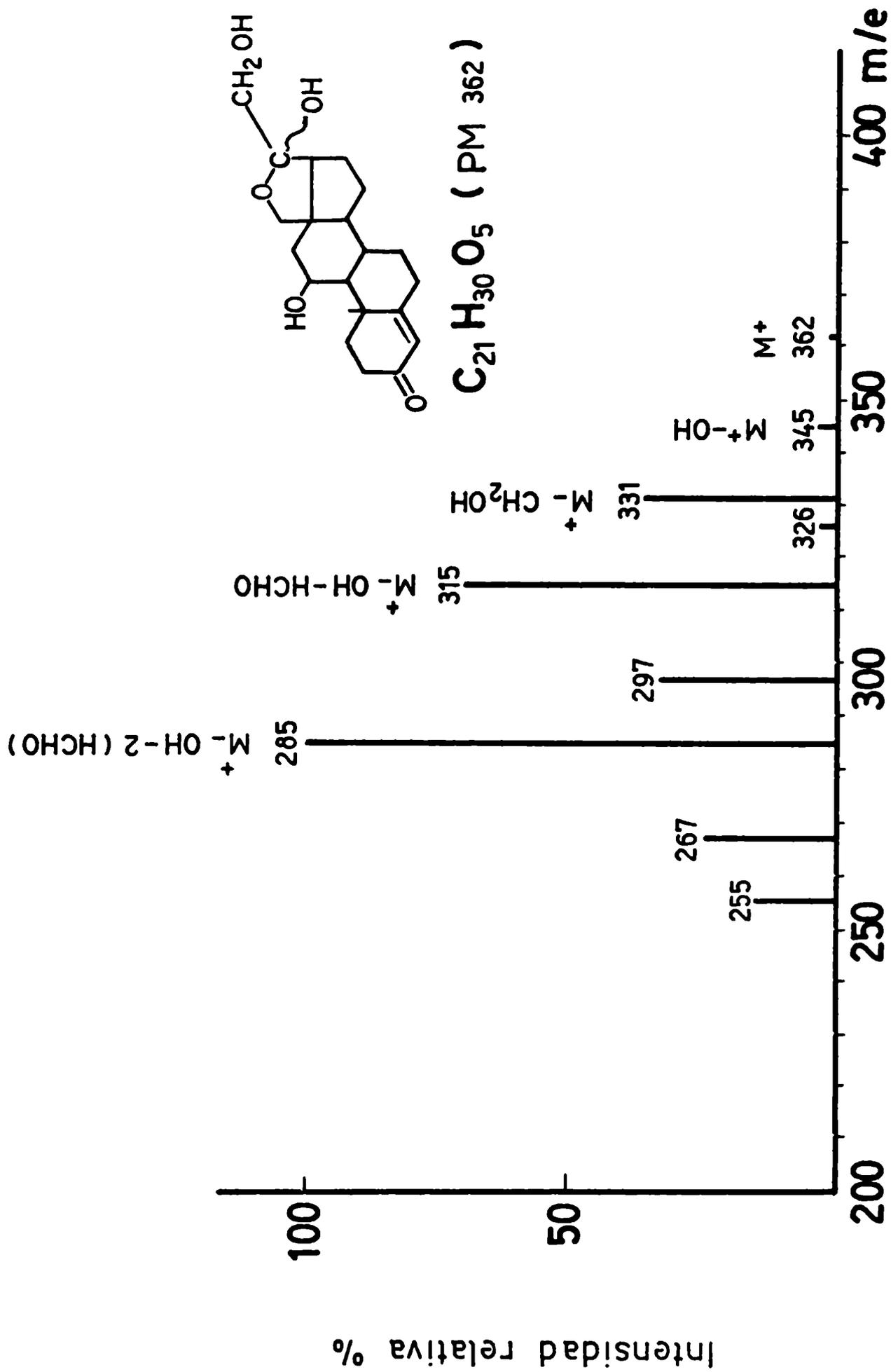


Fig. 22: Espectro de masa de 18. OH B.M.

La pérdida ulterior de un fragmento neutro de HCHO previamente unido a C-20,30 μm , produciría el pico base a $m/e = 315$. Este a su vez, por pérdida de una segunda molécula de HCHO proveniente de C-18 produciría el importante pico a $m/e = 285$.

En la figura 23 se muestra el espectro del compuesto $R_M^* 4.33$.

Espectro de masa del compuesto $R_M^* 4.33$

La forma menos polar obtenida por tratamiento en solución acuosa ácida ($1 \times 10^{-2} \text{ N}$) presenta un pico a $m/e = 344$ ($362-18 \mu\text{m}$) atribuible al ión molecular cuya estructura sería la de un producto de deshidratación de la forma más polar M.

Tal pérdida de agua, con formación de una unión éter, puede ocurrir entre los grupos OH en C-11 y C-18 ($136,258-260$).

Alternativamente, la molécula de agua podría provenir del grupo OH en C-20 y un H en C-21 de la estructura hemiacetalica, que por un posterior reordenamiento daría un aldehído en C-21.

La pérdida de $29 \mu\text{m}$, atribuibles a un fragmento CHO de este aldehído en C-21 podría producir el pico a $m/e = 315$ correspondiente a un ión oxonio. Este ión por pérdida de $18 \mu\text{m}$, H_2O , podría producir el pico a $m/e = 297$ ó bien por pérdida de $29 \mu\text{m}$ correspondientes a un fragmento CHO de C-20, dar el pico a $m/e = 286$. Este, a su vez podría por pérdida de un átomo de H dar origen al pico base a $m/e = 285$ que correspondería a un ión carbonio con una unión éter entre C-11 y C-18.

Si la estructura de $R_M^* 4.33$ fuese la de un éter entre C-11 y C-18 como se mencionó anteriormente, la pérdida de $31 \mu\text{m}$, correspondientes a un grupo CH_2OH en C-21 daría cuenta del pico a $m/e = 313$. Este por pérdida de un fragmento neutro de CO daría el pico base a $m/e = 285$, cuya estructura sería exactamente igual a la ya propuesta, independientemente de su origen.

Este último camino de fragmentación evidenciaría la presencia de un compuesto carente de un sistema cerrado entre C-18 y C-20 en $R_M^* 4.33$, lo que indicaría que $R_M^* 4.33$ es una mezcla que no puede separarse con la metodología empleada.

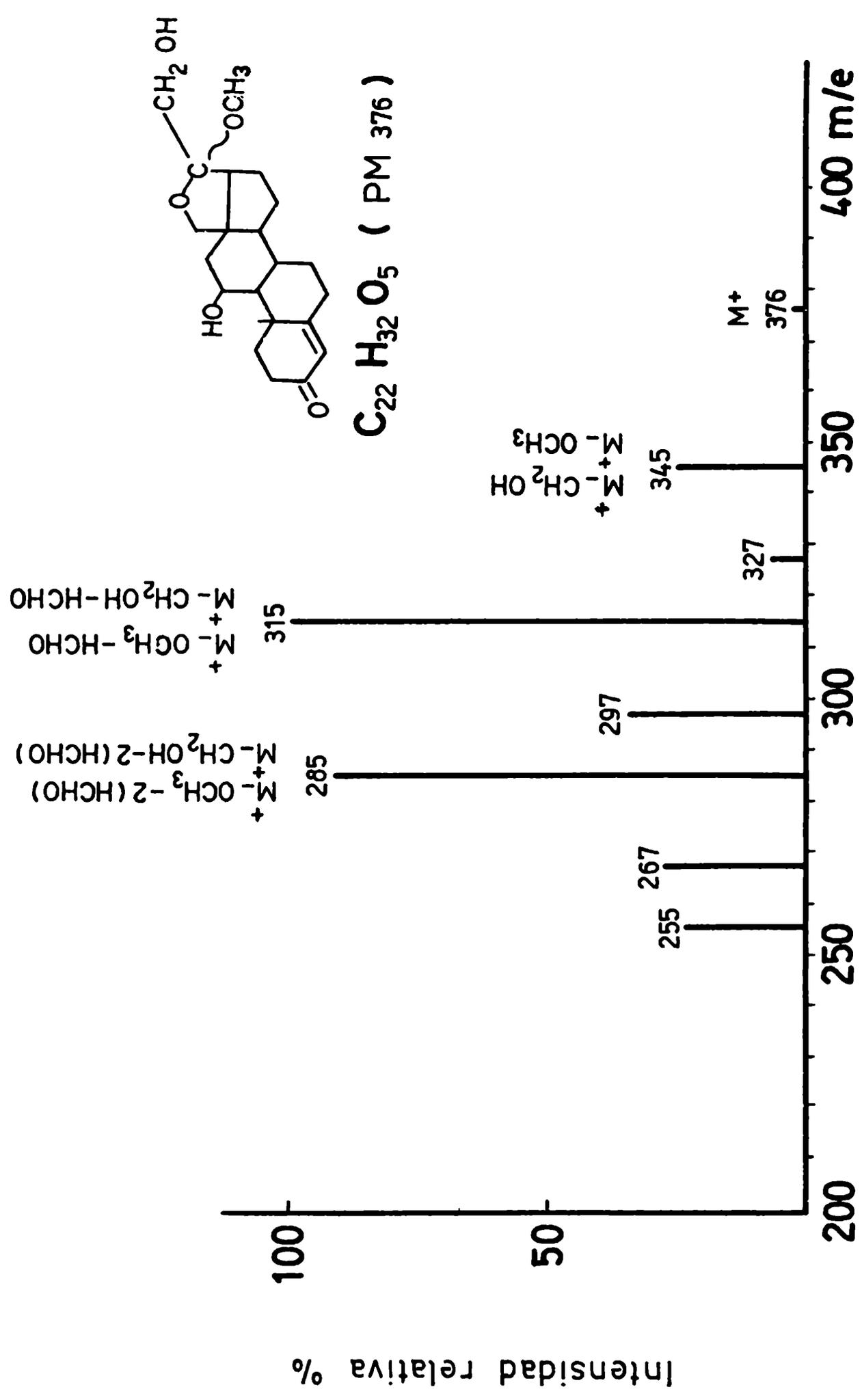


Fig.23: Espectro de masa de R_M 4.33.

El ión correspondiente a $m/e = 285$ por pérdida de una molécula de HCHO de C-18, produciría el pico a $m/e = 255$, el cual a su vez perdiendo un fragmento neutro de cetena del anillo A, correspondiente a 42 um, daría el pico a $m/e = 213$.

Alternativamente, la pérdida de agua, 18 um, también proveniente del anillo A, daría el pico a $m/e = 237$.

En la figura 24 se muestra el espectro de masa del compuesto $R_M^* 4.33$.

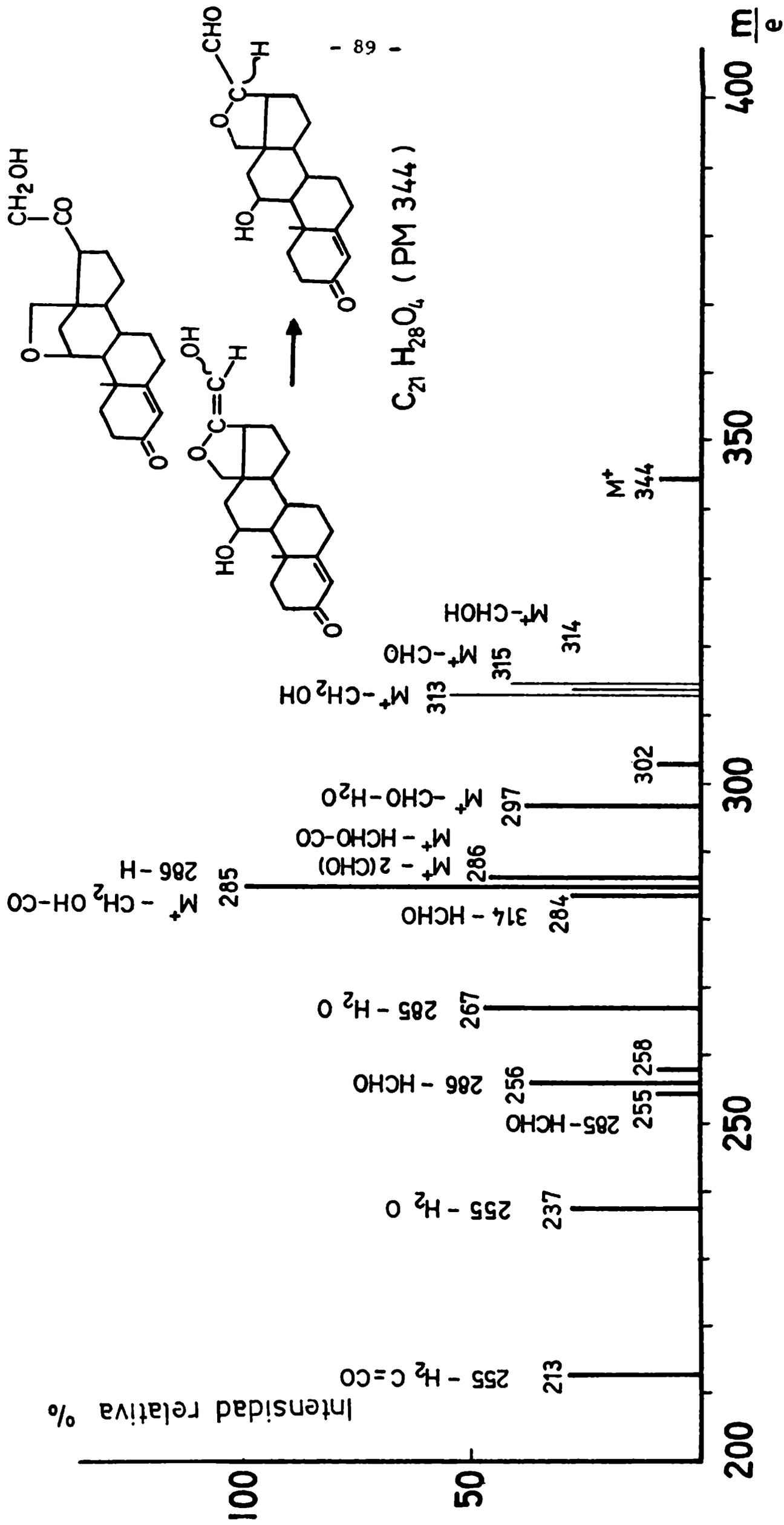


Fig.24: Espectro de masa de $R_M^* 4.33$.

VI.b Estudios con 18 OH Progesterona

Espectro de masa del compuesto I

La forma más polar de 18 OH prog (compuesto I) presenta un ión molecular a $m/e = 330$. La señal a $m/e = 313$ puede atribuirse a la pérdida de un grupo OH unido a C-20 en la estructura hemiacetálica.

El importante pico a $m/e = 312$ puede atribuirse a la pérdida de $18 \text{ um}, \text{H}_2\text{O}$, entre C-20 y C-21.

La presencia del pico a $m/e = 270$ podría explicarse a partir del ión a $m/e = 330$ por pérdida de $42 \text{ um}, \text{CH}_2\text{CO}$. Este resto puede provenir de cetena del anillo A ($\text{C}_1 - \text{C}_2$) o bien la misma pérdida proveniente de C20-C21, dando así origen a dos estructuras posibles para el ión $m/e = 270$ (fig 25).

La presencia del ión a $m/e = 255$ puede atribuirse a la pérdida de $15 \text{ um}, \text{CH}_3$, a partir del ión a $m/e = 270$, probablemente en C-19 ó C-21.

El ión a $m/e = 228$ podría interpretarse como la pérdida de $42 \text{ um}, \text{CH}_2\text{CO}$, provenientes de C-20 y C-21 en la estructura del ión $m/e = 270$. Otra interpretación posible para el ión $m/e = 228$ podría ser su formación a partir del ión $m/e = 313$ por pérdida de 85 um correspondientes a CH_2CO y CH_2CHO respectivamente de acuerdo a lo propuesto por Djerassi (261).

A partir del ión a $m/e = 270$ la pérdida de $43 \text{ um}, \text{CH}_2\text{CHO}$, daría origen al ión a $m/e = 227$. Este a su vez por pérdida de $42 \text{ um}, \text{CH}_2\text{CO}$, en C-20 y C-21 daría origen al pico a $m/e = 185$.

La presencia del ión a $m/e = 167$ podría explicarse a partir del M^+ por pérdida de 163 um por ruptura entre C-9 y C-11 y C-8 y C-14 con migración de 3 H (261-264).

El pico base a $m/e = 149$ puede atribuirse a la pérdida de $121 \text{ um}, \text{C}_8\text{H}_9\text{O}$, a partir de una de las estructuras postuladas del ión a $m/e = 270$, aquella que conserva el anillo A intacto (fig 25).

La presencia del ión a $m/e = 124$ puede atribuirse a la pérdida de $206 \text{ um}, \text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ con migración de 2 H a partir del M^+ (261-264).

El espectro del compuesto I se muestra en la figura 26.

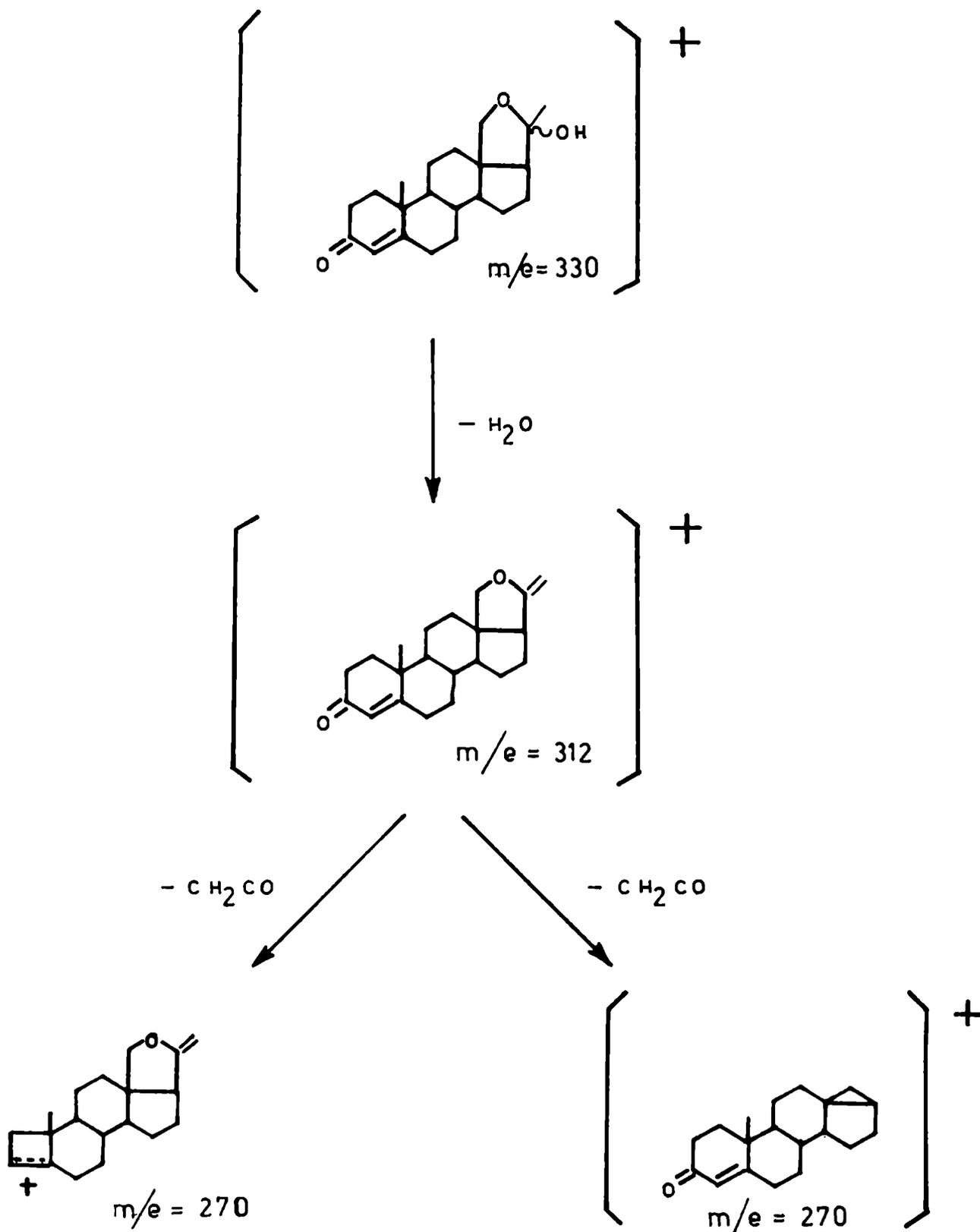


Fig.25: Esquema de fragmentación propuesto para la formación de iones a $m/e = 270$ a partir del compuesto I.

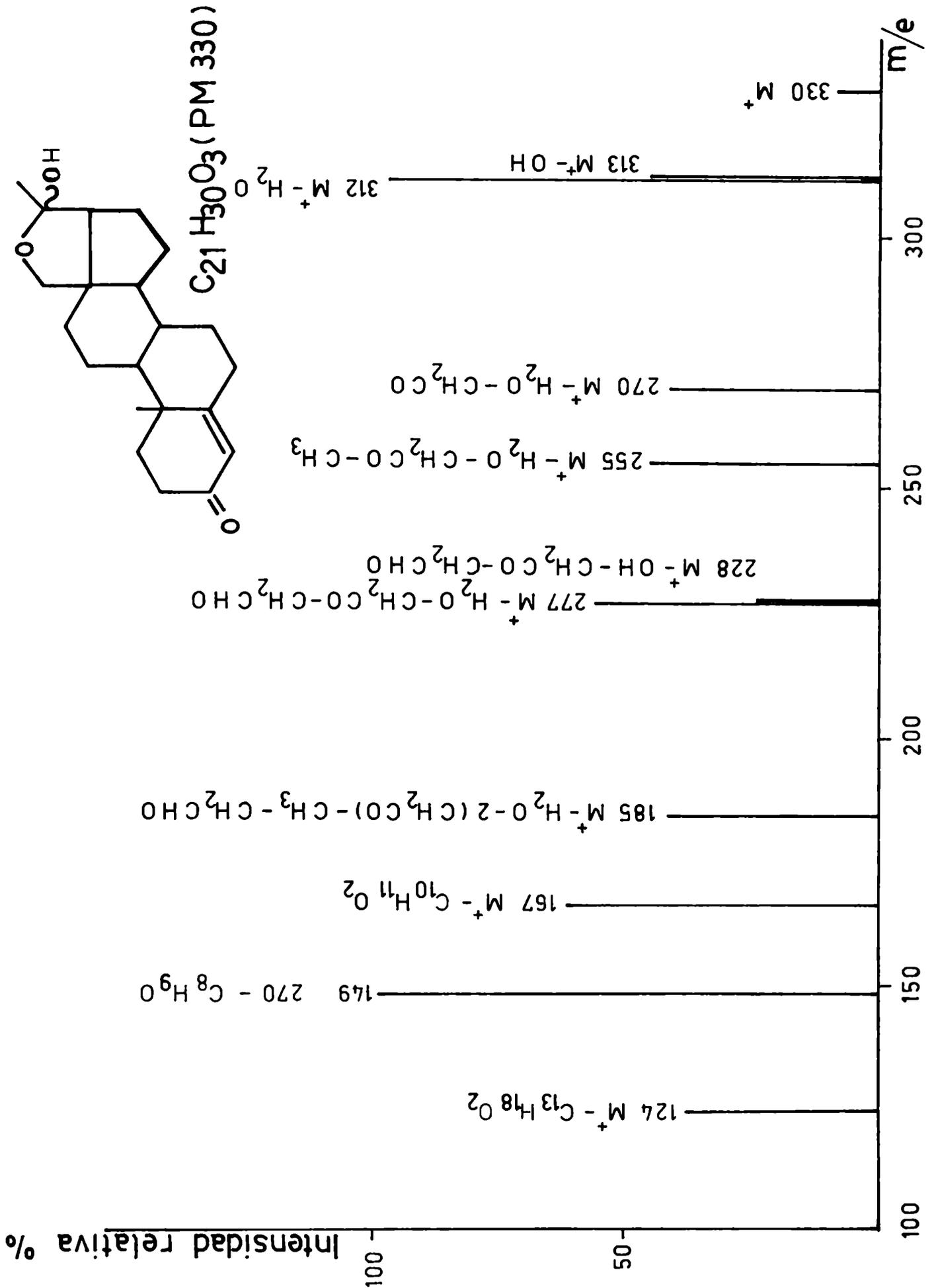


Fig.26: Espectro de masa del Compuesto I.

Espectro de masa del compuesto II

La única forma menos polar de 18 OH progesterona obtenida por estacionamiento en metanol, presenta un ión molecular a $m/e = 344$ correspondiente al metóxiderivado en C-20 de la estructura hemiacetálica.

El pico base a $m/e = 313$ puede atribuirse a la pérdida de 31 um correspondientes a OCH_3 ó CH_2OH en C-20 ó C-21 respectivamente. La señal a $m/e = 312$ puede racionalizarse como la misma pérdida indicada anteriormente a partir del ión $M^+ - 1$.

La presencia del pico a $m/e = 270$ puede atribuirse a la pérdida de 43 um, CH_3CO , ó 42 um, CH_2CO , a partir de los iones de $m/e = 313$ ó $m/e = 312$ respectivamente.

El ión a $m/e = 270$ formado por pérdida de 42 um a partir del ión a $m/e = 312$ puede tener 2 estructuras posibles como se mencionó para el compuesto I.

La figura 27 muestra el esquema de racionalización propuesto para la formación del ión a $m/e = 270$ a partir del ión M^+ a $m/e = 344$. El ión a $m/e = 255$ puede interpretarse como la pérdida de 15 um, CH_3 en C-19 a partir del ión a $m/e = 270$.

La presencia del ión a $m/e = 252$ puede atribuirse a la pérdida de 18 um, H_2O , a partir del ión a $m/e = 270$.

La señal a $m/e = 228$ puede interpretarse como la pérdida de 42 um, CH_2CO , ceteno del anillo A, a partir de una de las estructuras posibles del ión a $m/e = 270$ ó bien a la pérdida de 85 um, CH_2CO y CH_3CO , a partir del ión a $m/e = 313$ (261).

El ión a $m/e = 185$ puede atribuirse a la pérdida de 43 um, C_3H_7 , a partir del ión a $m/e = 228$.

La presencia del ión a $m/e = 149$ puede atribuirse, al igual que en el compuesto I a la pérdida de 121 um, $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}$, a partir de una de las estructuras postuladas del ión a $m/e = 270$, la que conservaría intacto el anillo A (fig.27).

La interpretación del ión a $m/e = 124$ puede interpretarse de manera análoga a la descrita para el compuesto I con pérdida en este caso de 168 um, $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$.

La figura 28 muestra el espectro del compuesto II.

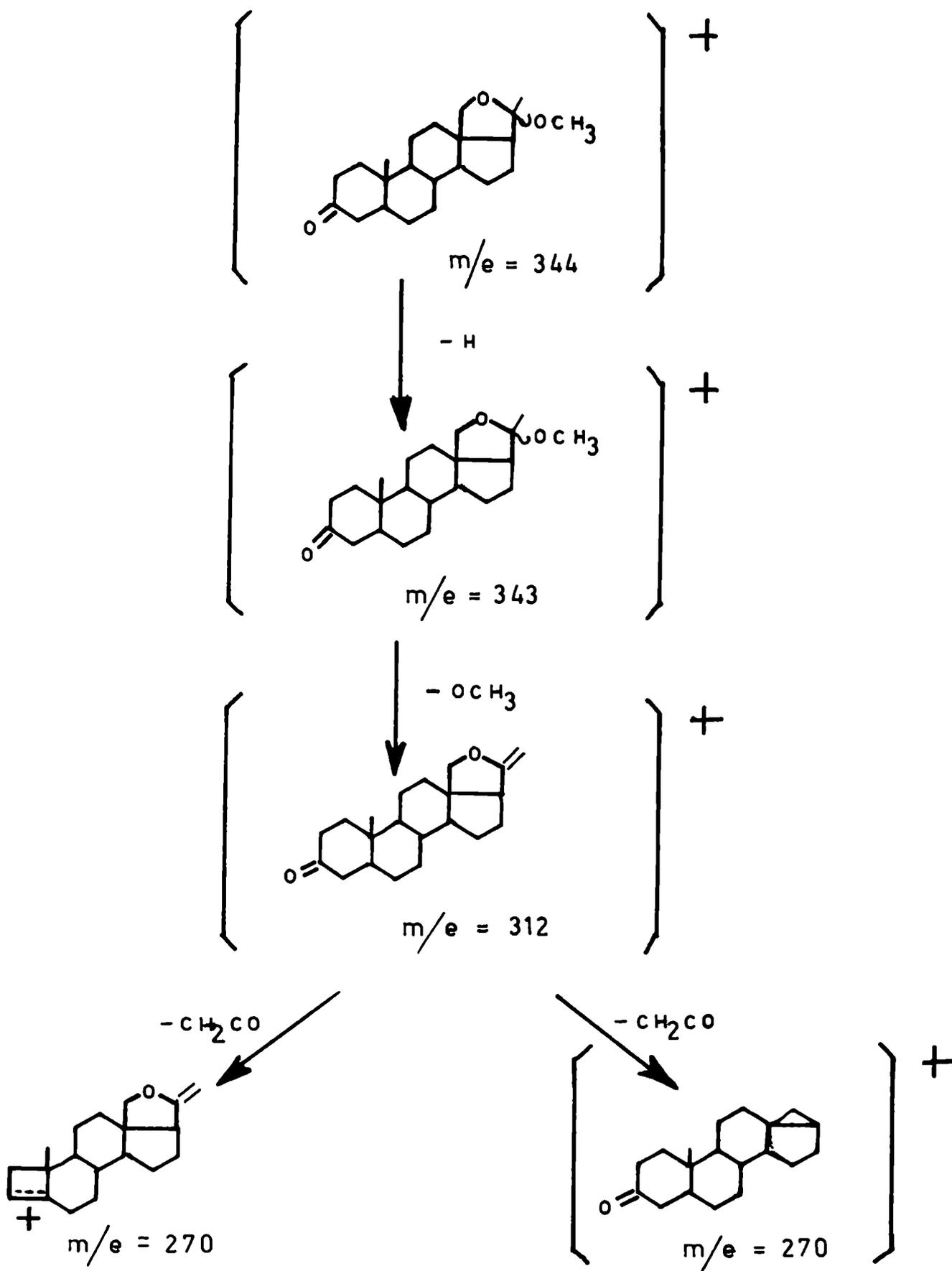


Fig. 27: Esquema de fragmentación propuesto para la formación de iones a $m/e = 270$ a partir del compuesto II.

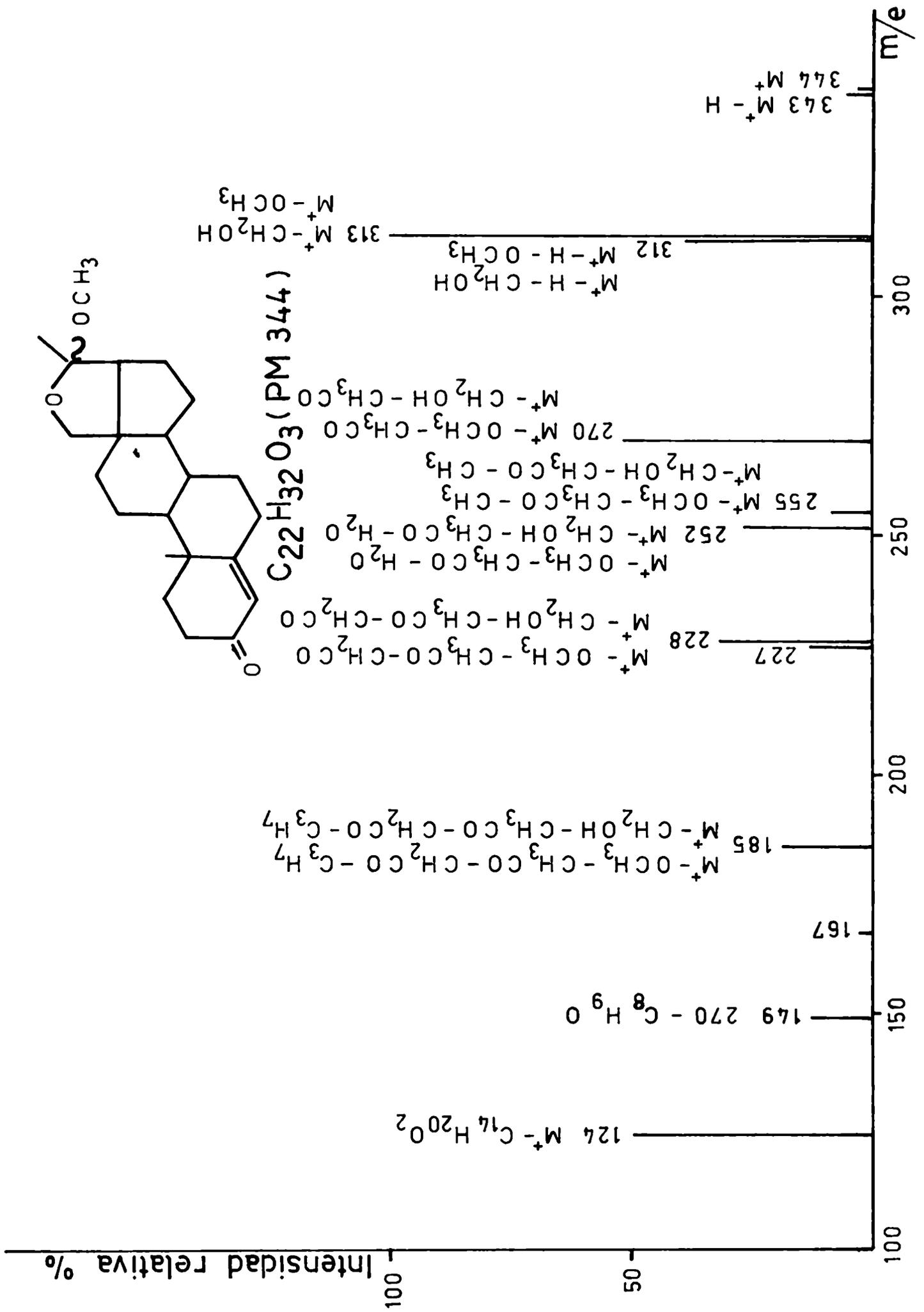


Fig.28: Espectro de masa del Compuesto II.

Espectro de masa del compuesto III

El compuesto III, una de las formas menos polares de 18 OH Progesterona obtenidas por tratamiento con ácido, presenta un ión molecular a $m/e = 312$ que correspondería a un producto de deshidratación de 18 OH progesterona entre C-20 y C-21.

El pico a $m/e = 313$ correspondería al ión molecular protonado; en ciertos casos éste es más estable que el propio M^+ como lo señalan ciertos autores (253).

La presencia del ión a $m/e = 270$ podría interpretarse como para los dos compuestos descritos anteriormente, por pérdida de 42 um, CH_2CO , dando origen a 2 estructuras posibles para este ión (fig 29). Las señales correspondientes a los otros iones de distinta m/e pueden racionalizarse de manera análoga a la descrita para los compuestos I y II.

El pico base a $m/e = 149$ puede atribuirse a la pérdida de 121 um, C_8H_9O , a partir de una sola de las estructuras probables del ión a $m/e = 270$, la que mantiene el anillo A intacto (fig 29).

La figura 31 muestra el espectro del compuesto III.

Espectro de masa del compuesto IV

El compuesto IV presenta un ión molecular a $m/e = 312$ que puede atribuirse a un producto de deshidratación de 18 OH Progesterona en C-17 y C-20, con mayor movilidad cromatográfica que la del compuesto III anteriormente descrito.

La presencia del ión a $m/e = 313$ podría interpretarse de manera análoga a la mencionada para el compuesto III.

La señal a $m/e = 270$ puede atribuirse a la pérdida de 42 um, CH_2CO a partir del ión a $m/e = 312$.

Si la estructura para el ión a $m/e = 312$ fuera la propuesta la pérdida de 42 um, CH_2CO , sólo podría provenir de cetona del anillo A dando origen así a una sola estructura posible del ión a $m/e = 270$ a diferencia de lo observado en los otros 3 compuestos.

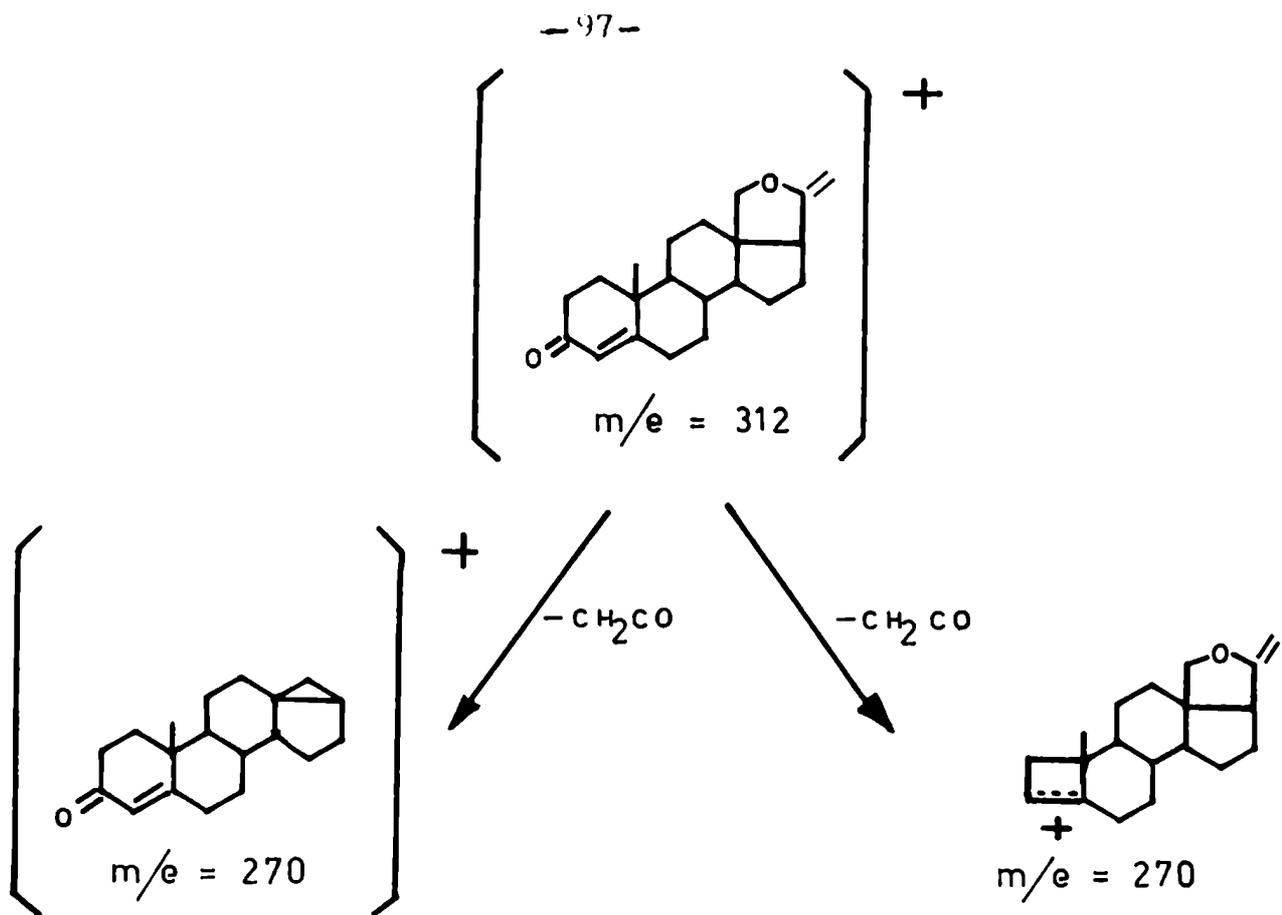


Fig. 29: Posibles estructuras del ión a $m/e = 270$ a partir del compuesto III.

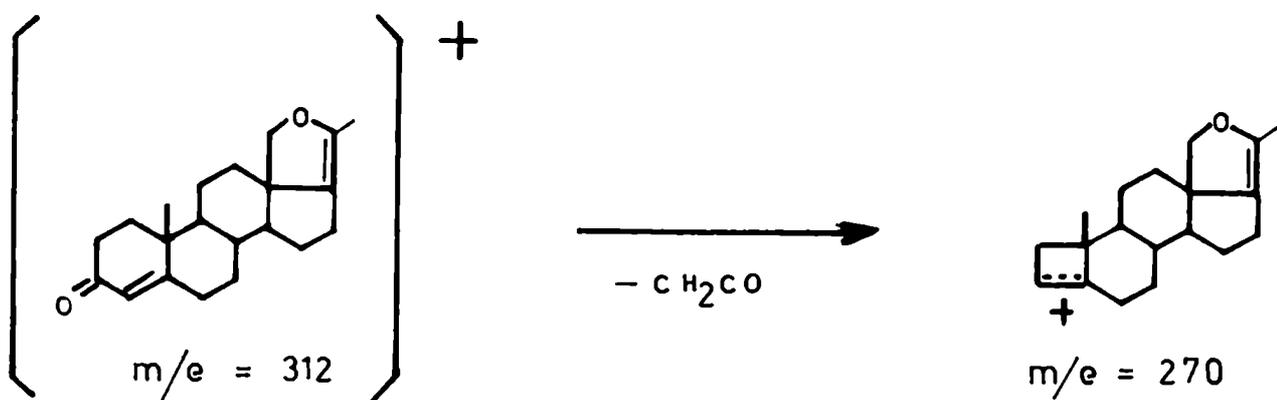


Fig. 30: Posible estructura del ión a $m/e = 270$ a partir del compuesto IV.

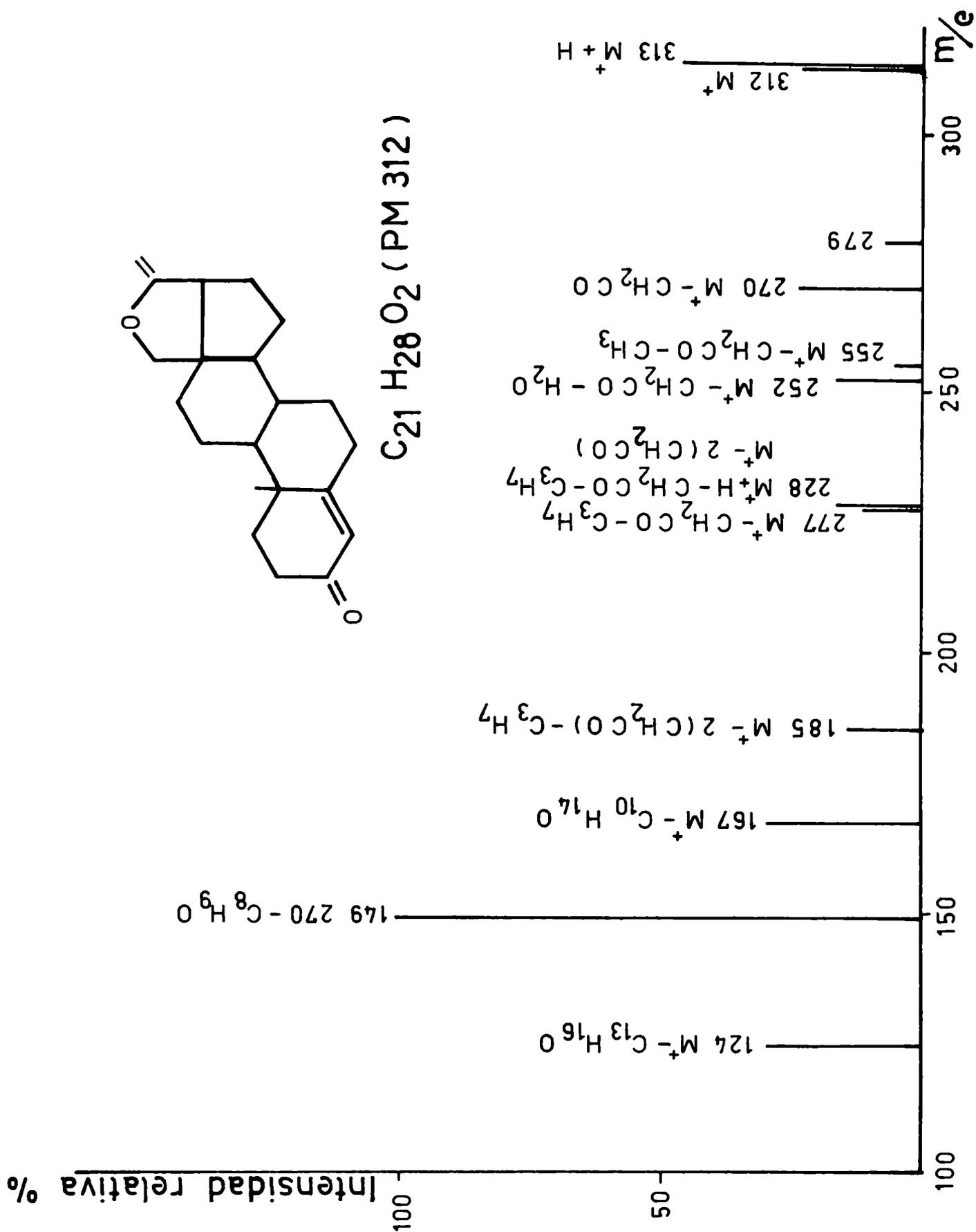


Fig. 31 : Espectro de masa del Compuesto III.

El pico base a $m/e = 124$ así como los otros de mayor m/e pueden racionalizarse de manera análoga a lo hecho anteriormente.

La ausencia de señal a $m/e = 149$ podría atribuirse al hecho de que la única estructura propuesta para el ión a $m/e = 270$ no podría explicar un esquema de fragmentación que condujera a la formación del ión a $m/e = 149$ (fig 30).

Por otra parte según la racionalización propuesta la presencia del ión a $m/e = 228$ sólo podría explicarse en este caso por la pérdida de 85 um , CH_2CO y C_3H_7 , (261) a partir del $\text{M}^+ + 1$ y no a partir del ión a $m/e = 270$ por pérdida de 42 um (fig 30).

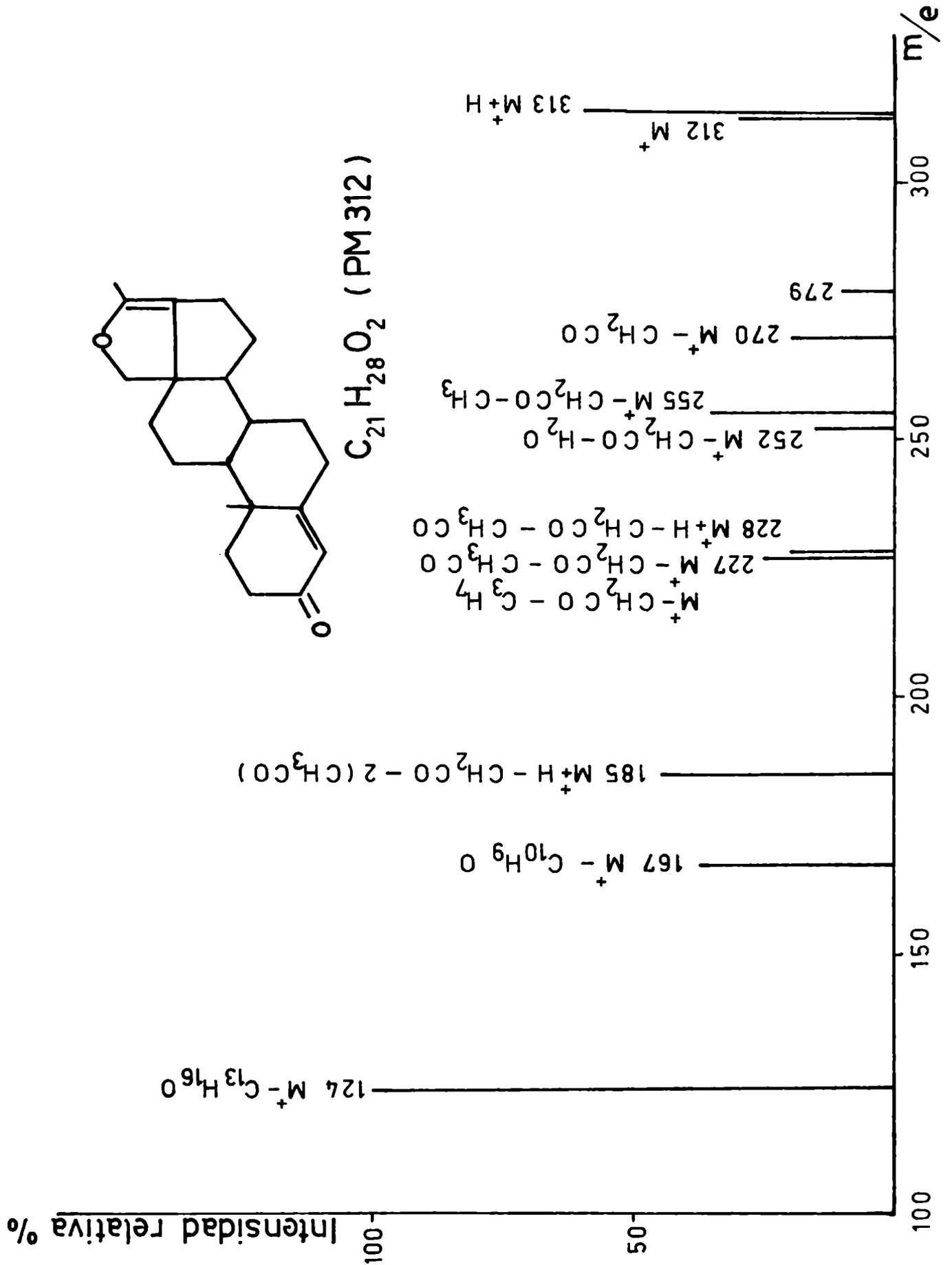


Fig. 32: Espectro de masa del Compuesto IV.

VI.c Estudios con 18 OH Desoxicorticosterona

Estos espectros fueron realizados en un espectrómetro de masa Varian-Mat CH 7 A, acoplado a una computadora (Varian Data Machines), utilizando como en los anteriores inserción directa de la muestra.

Los espectros se realizaron a 20 y 70 eV y 150 y 260 °C respectivamente.

Espectro de masa del compuesto X

La forma más polar de 18 OH DOC (Compuesto X) presenta un ión molecular a $m/e = 346$ que sólo pudo detectarse a 20 eV y 260 °C. El ión a $m/e = 329$ puede atribuirse a la pérdida de 17 um (OH) en C-20.

La señal a $m/e = 328$ puede interpretarse como la pérdida de 18 um (H_2O) entre C 20-21.

El ión a $m/e = 316$ correspondería a la pérdida de 30 um (HCHO) a partir del C-21.

El pico base a $m/e = 315$ puede interpretarse como la pérdida de 31 um (CH_2OH) a partir del C-21

La señal a $m/e = 299$ puede atribuirse a la pérdida de 17 um (OH) adicionales a partir del ión a $m/e = 316$.

La presencia del ión a $m/e = 281$ podría interpretarse como la pérdida de 18 um (H_2O) a partir del ión a $m/e = 299$.

El ión a $m/e = 269$ correspondería a la pérdida de 77 um (2 HCHO, OH) a partir del ión molecular.

La figura 33 muestra el espectro de masa obtenido para el compuesto X.

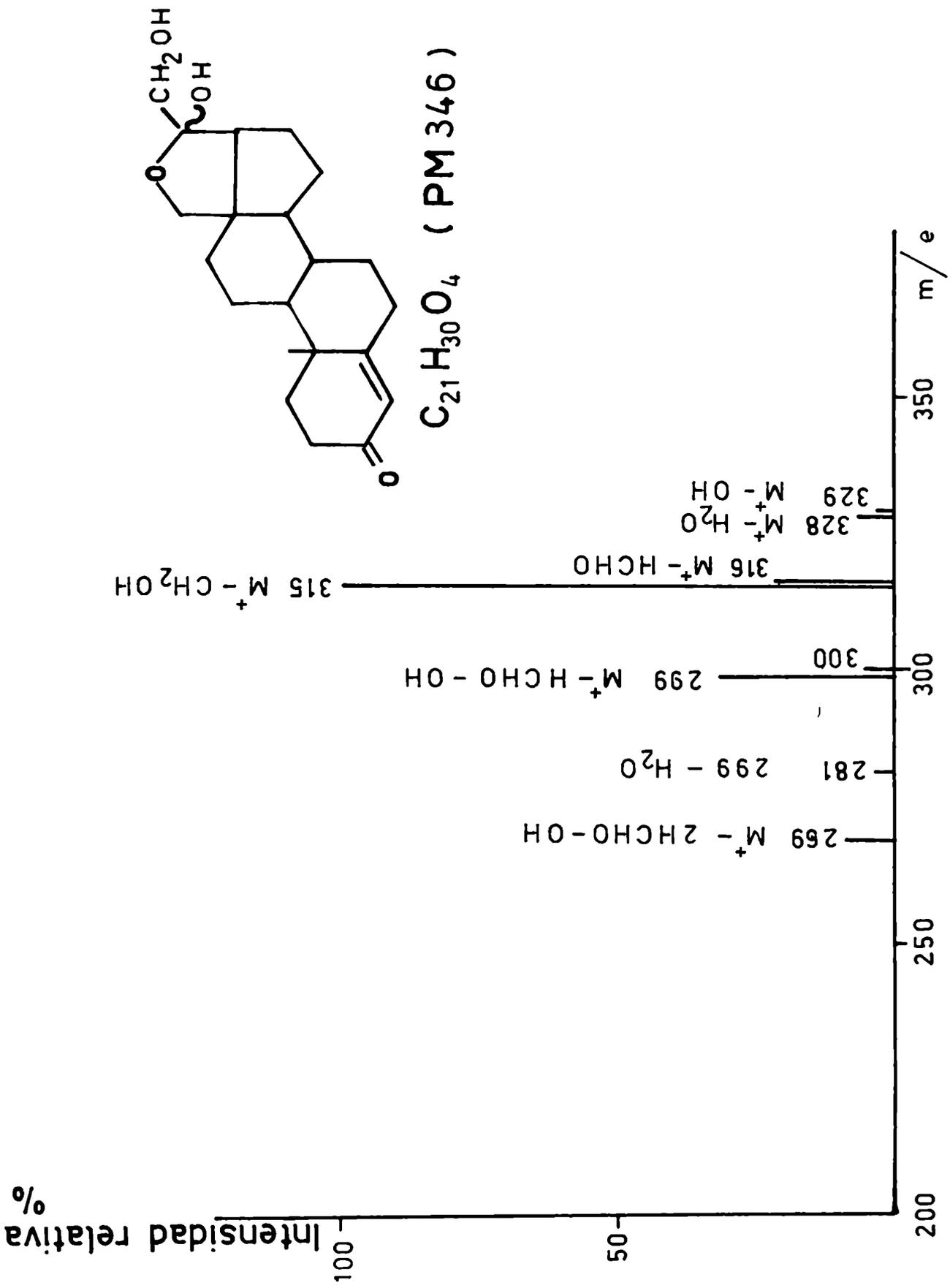


Fig. 33: Espectro de masa del Compuesto X.

Espectro de masa del compuesto Y

El compuesto Y de 18 OH DOC obtenido por estacionamiento en metanol no presenta bajo las condiciones ensayadas señal correspondiente al ión molecular.

La señal a $m/e = 359$ podría interpretarse como $M^+ - 1$ (H).

El ión a $m/e = 330$ podría atribuirse a la pérdida de 30 um (HCHO) en C-21.

La importante señal a $m/e = 329$ correspondería a la pérdida de 31 um, atribuibles a OCH_3 en C-20 ó bien a CH_2OH en C-21.

El ión a $m/e = 312$ podría interpretarse como la pérdida de 17 um (OH) adicionales a partir del ión a $m/e = 329$.

El pico base a $m/e = 299$ podría atribuirse a la pérdida de 30 um (HCHO) a partir del ión a $m/e = 329$.

La figura 34 muestra el espectro de masa del compuesto Y.

Espectro de masa del compuesto Z

Si bien para este compuesto no se obtuvieron resultados muy reproducibles bajo las diferentes condiciones de trabajo, a 70 eV y 150 ° C se observó siempre la presencia de un pico a $m/e = 328$ atribuible a M^+ , que podría interpretarse como correspondiente a un producto de deshidratación ($346 - 18 = 328$) de 18 OH DOC. Dicha pérdida podría ocurrir entre C-20 y C-21.

En las mismas condiciones es dable observar la señal a $m/e = 300$ que correspondería al pico base a 20 eV y 260 °C y puede interpretarse como la pérdida de un fragmento muy estable de 28 um (CO) provenientes de C-21.

El ión a $m/e = 299$ correspondería a $M^+ - 29$ um (CHO) proveniente de C-21.

A $m/e = 270$ se observa otra señal probablemente debida a la pérdida de 29 um adicionales (CHO) en C-20, a partir del ión a $m/e = 299$.

Bajo las otras condiciones de trabajo 20 eV y 150°C y 260 °C así como a 70 eV y 260 °C respectivamente no se obtiene demasiada reproducibilidad.

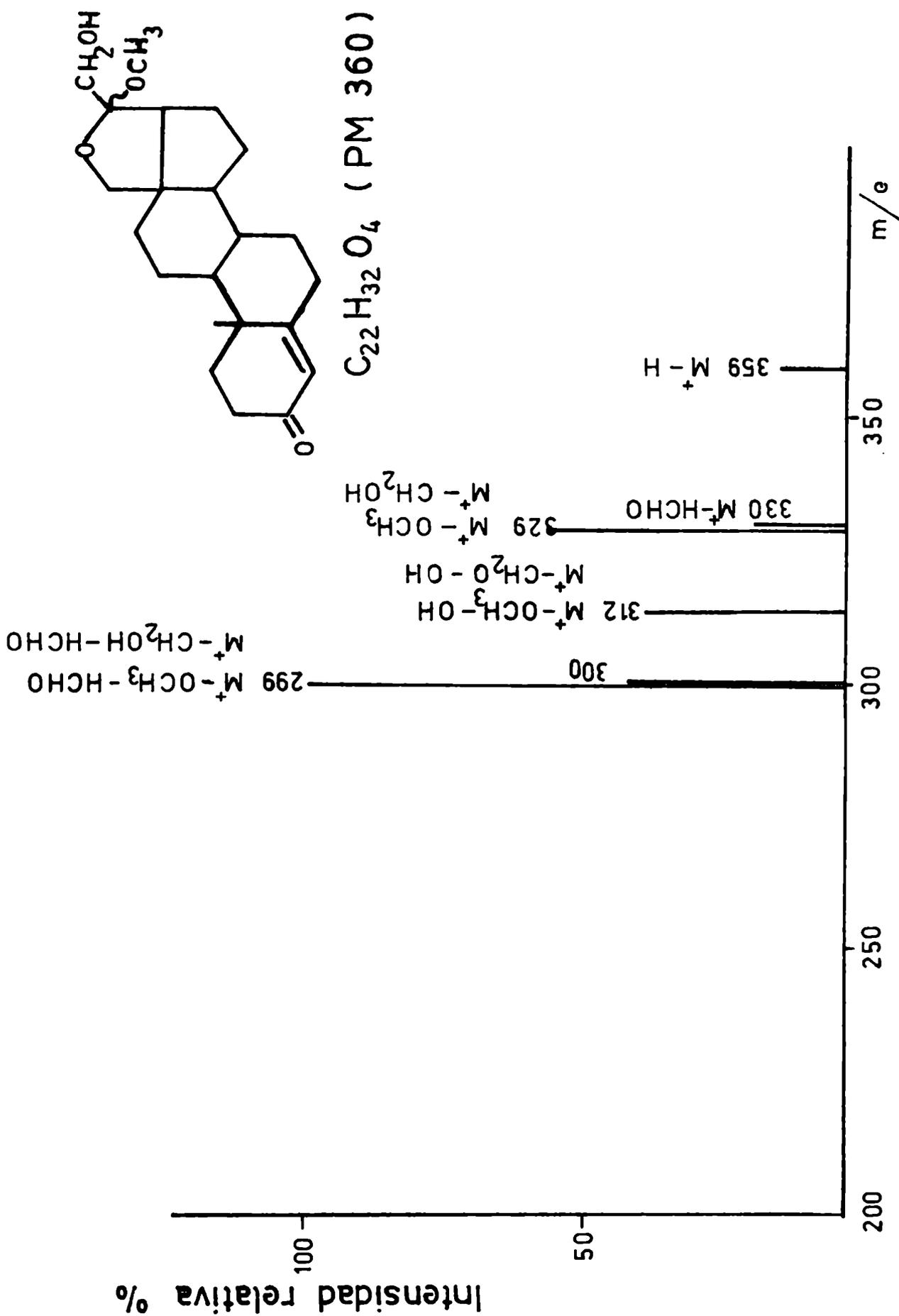


Fig. 34: Espectro de masa del Compuesto Y.

VII. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA MEDIANTE DOBLE MARCACION ISOTOPICA

Con el objeto de confirmar la estructura propuesta de la 18 OH B, (formas M y R_M 4.33) se hicieron diferentes ensayos:

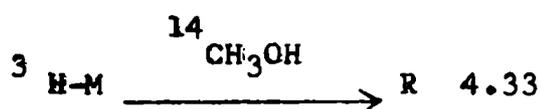
a) Incorporación de ¹⁴CH₃OH a 18 OH B - ³H-M.

b) Reversión de R_M 4.33 (³H + ¹⁴C) en M en H₂O radioinerte.

c) Incorporación de ³H₂O a 18 OH B (R_M 4.33 - ¹⁴C).

d) Reversión de M (³H + ¹⁴C) a R_M 4.33 en CH₃OH radioinerte.

a) Incorporación de ¹⁴CH₃OH a 18 OH B ³H-M



Se sabía que la forma más polar de 18 OH B, M, se convierte en la menos polar, R_M 4.33, por estacionamiento en metanol.

Para comprobar, si como lo indicaban los espectros de masa, en la estructura de R_M 4.33 habían entrado fragmentos de la molécula del solvente, se decidió medir la posible incorporación de ¹⁴CH₃OH en la forma más polar de 18 OH B - ³H, M.

Para ello primero fué necesario biosintetizar y purificar la 18 - OH B - ³H, M, a partir de 1-2³H-B como se describió en materiales y métodos.

Sobre una alícuota conveniente de 18 OH B - ³H (en todos los casos aproximadamente 40.000 dpm) de actividad específica conocida (60 Ci / mMol) se agregó 18 OH B radioinerte (aproximadamente 500 ug) de manera de obtener una actividad específica comparable a la del ¹⁴CH₃OH, que era 4.3 uCi / mMol.

La solución metanólica que contenía el esteroide así preparado se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de N₂. Al sólido se le agregó un pequeño volumen de H₂O destilada y se lo dejó 7 días a 31°C para su total transformación en M. Al cabo de ese tiempo sobre una alícuota se verificó la identidad del compuesto por cromatografía.

fía en el sistema Bush B₅, comprobándose la presencia de la forma M únicamente. El resto del material se llevó a sequedad bajo N₂. Luego se disolvió en un pequeño volumen (250 ul) de ¹⁴CH₃OH de la actividad específica indicada.

Los tubos con la solución se cerraron a la llama y se dejaron a 31°C por espacio de 10-15 días para obtener una transformación apreciable en la forma menos polar, R_M 4.33.

Luego se procedió a analizar los productos de la reacción en el sistema Bush B₅.

La detección mediante luz UV y radiocromatografía mostró coincidencia de los dos picos de radiactividad con las dos zonas con masa apreciable de esteroide.

Ambas zonas fueron eluidas por separado con CH₃OH radioinerte. Las soluciones se homogeneizaron y se tomaron alícuotas para hacer las determinaciones cuantitativas. Las alícuotas se colocaron en viales de vidrio y evaporaron a sequedad bajo N₂. Se agregó luego 10 ml de la solución centelladora y se procedió a la determinación de la relación ³H / ¹⁴C.

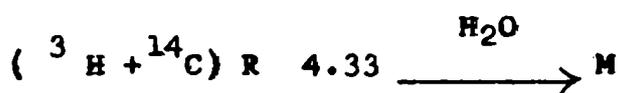
En los primeros ensayos dicha relación fue calculada por el método de la relación de canales. Al disponerse de un contador de centelleo líquido equipado con standard externo, se hicieron determinaciones empleando este último método.

En ambos casos se tuvo en cuenta el grado de " quenching " .

De esta manera se demostró la presencia inequívoca de ¹⁴C en la zona menos polar, correspondiente al compuesto caracterizado como R_M 4.33, obtenido bajo las condiciones descriptas.

En ningún caso se detectó ¹⁴C en el compuesto más polar M remanente.

b) Estudio de la reversión de ³H-¹⁴C -R_M 4.33 a M en H₂O radioinerte



Por ensayos previos nuestros se sabía también que la forma R_M 4.33 se convertía en M por contacto con agua destilada.

Se decidió entonces investigar los posibles cambios de la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ cuando se producía esta interconversión.

Para ello se evaporó la solución en metanol de ($^3\text{H} + ^{14}\text{C}$)- R_M 4.33 bajo N_2 .

Luego se agregó un pequeño volumen de H_2O destilada (250 ul), se homogeneizó y se dejó a 31 °C durante 1 semana para obtener la transformación en M.

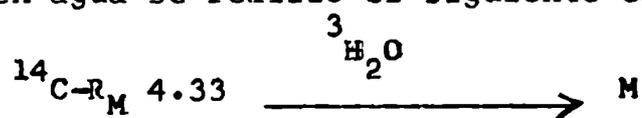
La metodología a seguir fué similar a la descrita anteriormente. En este caso sólo se observó una mancha única por absorción al UV y un sólo pico de radiactividad, coincidente con la mancha.

Dicha zona se eluyó con metanol y sobre una alícuota se procedió a determinar la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$. Esta dió ∞ , ya que no pudo detectarse la presencia de ^{14}C en el compuesto.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos.

c) Incorporación de $^3\text{H}_2\text{O}$ en $^{14}\text{C}-R_M$ 4.33

Para analizar la naturaleza del compuesto obtenido por reversión de R_M 4.33 en agua se realizó el siguiente ensayo:



Para ello fué necesario biosintetizar previamente la 18 OH B- ^{14}C (A.F. 57.3 mCi/mMol) a partir de 4- ^{14}C -B y proceder a su aislamiento como se describió anteriormente.

Se tomó una alícuota conveniente de 4- ^{14}C -18 OH B (100.000 -200.000) dpm), forma M y se diluyó con 18 OH B radioinerte (30-50 ug) para obtener una actividad específica comparable a la del $^3\text{H}_2\text{O}$ (200 mCi/ml).

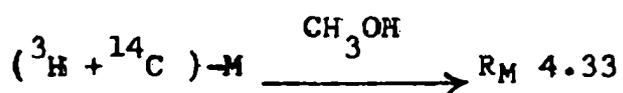
Luego se agregó metanol radioinerte a los tubos que contenían el esteroide para su transformación en la forma menos polar, R_M 4.33 operándose de la manera habitual.

Al cabo de 10-15 días se analizó en el sistema Bush B_5 observándose dos zonas que absorvían al UV, coincidentes con los picos de radiactividad.

La zona correspondiente a R_M 4.33 se cortó y el trozo de papel se colocó en un vial, al que se agregó un pequeño volumen de $^3\text{H}_2\text{O}$. Se procedió como se describió en b) obteniéndose una única mancha y un único pico de radiactividad coincidentes.

La zona fué eluída con metanol y sobre una alícuota se procedió a determinar la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ observándose la presencia de ^3H en el compuesto M así formado.

d) Reversión de ($^3\text{H} + ^{14}\text{C}$) - M a R_M 4.33 en CH_3OH radioinerte



Con el objeto de analizar el destino del ^3H cuando M se interconvierte en R_M 4.33 por estacionamiento en metanol radioinerte se procedió de la siguiente manera.

El resto de la solución metanólica proveniente del ensayo anterior c) se dejó bajo las condiciones ya descriptas para su conversión en R_M 4.33.

Luego se analizaron los productos de la reacción con la metodología ya mencionada.

La determinación de la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en el compuesto R_M 4.33 así obtenido indicó la ausencia de ^3H al regenerarse este compuesto por estacionamiento de ($^3\text{H} + ^{14}\text{C}$) - M en metanol.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II.

Tabla: II Incorporación de $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ en $^3\text{H-M}$ y $^3\text{H}_2\text{O}$ en $^{14}\text{C-R}_M$ 4,33

Reacción	Relación Molar			
	Directa		Inversa	
	$\frac{^{14}\text{CH}_3\text{OH incorporado}}{\text{M}}$	$\frac{^3\text{H}_2\text{O incorporada}}{\text{R}_M 4,33 (a)}$	$\frac{^{14}\text{CH}_3\text{OH remanente}}{\text{M regenerado}}$	$\frac{^3\text{H}_2\text{O remanente}}{\text{R}_M 4,33 regenerado}$
$^3\text{H-M} + ^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ \downarrow $(^{14}\text{C} + ^3\text{H}) - \text{R}_M 4,33$	0,85	-	0	-
$^{14}\text{C-R}_M 4,33 + ^3\text{H}_2\text{O}$ \downarrow $(^{14}\text{C} + ^3\text{H}) - \text{M}$	-	0,92	-	0

(a) suponiendo que se forma 1 molécula de $\text{R}_M 4,33$ por molécula de M .

VIII. ENSAYO DE LA CAPACIDAD PRECURSORA DE R_M^* 4.33

Aunque la aldosterona es el principal esteroide de la corteza adrenal relacionado con la regulación del metabolismo de electrolitos, su camino de biosíntesis aún no ha sido elucidado.

Es conocido el hecho de que se obtengan buenos rendimientos de aldosterona cuando se utiliza como precursor corticosterona (126, 149-153).

Parecería muy probable, y por otra parte ha sido sugerido por varios grupos de investigadores (154-156), que el grupo CH_3 en C-18 de la B sea convertido en el aldehído en C-18 de la aldosterona a través del grupo alcohol en C-18 de la 18 OH B.

Sin embargo todos los intentos de utilizar 18 OH B como precursor biosintético de aldosterona han arrojado un pobrísimo rendimiento si se lo compara con el que se obtiene partiendo de B, excepto en el caso de Raman y col (155) quienes obtienen resultados comparables.

Por otra parte Damasco y Lantos (145) informaron que una forma menos polar de 18 OH B, la única descrita hasta ese momento tenía mayor capacidad como precursor de la aldosterona, que la forma más polar M.

En el presente estudio demostramos la existencia de numerosas formas menos polares de 18 OH B, determinándose la estructura más probable de algunas de ellas.

Entre las formas estudiadas, sólo aquella obtenida por tratamiento con soluciones acuosas ácidas R_M^* 4.33 presentó alguna capacidad precursora de aldosterona.

Como se vió, mediante los estudios por espectrometría de masa, se halló que la probable estructura de uno de los componentes de R_M^* 4.33 sería la de un producto de deshidratación entre los C-11 y C-18. La estructura 11 β -18 éter propuesta está muy relacionada con la forma de aldosterona que probablemente predomina en soluciones acuosas, especialmente a la temperatura de los animales homeotermos (143).

En ensayos previos habíamos observado que cuando se incubaba B ó 18 OH B (formas M ó R_M^* 4.33) aún en ausencia de tejido se formaba

un compuesto cuya movilidad en el sistema Bush B₅ coincidía con el de la aldosterona. Sin embargo cuando se trató de caracterizar ese compuesto no pudo obtenerse una constancia en la relación $H/^{14}C$ de sus derivados.

En base a estos resultados decidimos incluir en los ensayos blancos denominados " químicos " y " biológicos " y las experiencias se llevaron a cabo como sigue:

VIII a. Preparación de los sustratos

la 1-2 ³H-B fué purificada como se describió en materiales y métodos.

La 1-2 ³H-18 OH B se obtuvo por biosíntesis, tal como se describió anteriormente. Luego se tomaron 14×10^6 dpm de la forma más polar de 18 OH B, correspondientes a aproximadamente 1.6 nmoles, se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ y se agregaron 500 ul de ClH 10⁻²N en agua.

La preparación homogeneizada se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se evaporó bajo N₂ hasta aproximadamente 50 ul. El compuesto R_M* 4.33 se aisló en la forma habitual, salvo el solvente de elución, sustituyendo el CH₃OH por Cl₂CH₂. Se llevó a volumen y determinó sobre una alícuota del 1 % la actividad mediante un contador de centelleo líquido.

Las incubaciones se realizaron en vasos de precipitado de 10 ml, a los cuales se agregó el precursor correspondiente (14×10^6 dpm.) en todos los casos, llevándolo a sequedad bajo N₂ para eliminar los solventes orgánicos.

VIII b. Preparación del tejido

Se utilizaron cuartos de suprarrenales de ratas, preparadas como se detalló en materiales y métodos.

VIII c. Ensayos

c₁. Controles químicos: se realizaron de modo idéntico a los incubados pero en ausencia de tejido.

c₂.Controles biológicos: estos controles sólo difirieron de los incubados en que los cuartos de suprarrenales fueron previamente calentados a 100 °C durante 15 minutos.

c₃.Incubados: a los vasos que ya contenían el precursor seco, se les añadió 1.84 ml de buffer Krebs-Ringer+Bicarbonato-Glucosa preparado inmediatamente antes de usar. Luego se agitaron en un baño metabólico tipo Dubnoff a 37°C durante 5 minutos, bajo atmósfera de carbógeno, para disolver el precursor.

A continuación se agregó a cada recipiente 85.0-⁺9.3 mg del "pool" de suprarrenales y se procedió a incubar en las condiciones descritas en materiales y métodos durante 90 minutos.

Las extracciones se realizaron con Cl₂CH₂ en la forma habitual. A cada extracto se agregó 50 ug de aldosterona radioinerte y 7600 dpm de 4-¹⁴C aldosterona. Luego se evaporó bajo N₂ hasta un pequeño volumen adecuado para sembrar las cromatografías, que se realizaron en el sistema Bush B₅ (231).

La zona radiactiva correspondiente a aldosterona (R_f 0.30) se eluyó y sobre una alícuota del 5 % se determinó la relación ³H/ ¹⁴C.

El 95 % remanente fué acetilado y los acetatos se analizaron según la técnica de Kliman y Peterson (232).

Los acetatos fueron eluidos y se tomaron alícuotas del 10 % para determinar la relación ³H/¹⁴C.

El resto del material, con movilidad característica del diacetato de aldosterona, se oxidó con Cr₂O₃ (232) para obtener la lactona correspondiente y se cromatografió en el sistema Cy-Bz como se detalló en materiales y métodos.

La zona radiactiva correspondiente a la lactona se eluyó en la forma habitual y sobre alícuotas del 10 % se determinó la relación ³H/¹⁴C.

La figura 35 muestra los resultados obtenidos.

Como puede observarse tales resultados indicarían una producción espontánea de aldosterona a partir de ambos precursores, incluso en presencia o ausencia de extracto hervido.

Puede apreciarse que en 5 de las 6 columnas la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ disminuye menos de un 5 % durante el último paso de purificación. Además en los incubados tal disminución ~~no~~ sobrepasa un 7 %.

En presencia de tejido, se obtiene un rendimiento 2 veces mayor cuando se utiliza como precursor B, respecto del obtenido a partir de R_M^* 4.33.

Por el contrario, en todos los controles ya sea en presencia o ausencia de tejido hervido R_M^* 4.33 demostró ser un mejor precursor espontáneo.

En los controles biológicos, R_M^* 4.33 fué 10 veces más eficiente que B, mientras que en los controles químicos lo fué el doble.

PRECURSOR	C		Ø		G	
	B	L	B	L	B	L
Rf · 0.30 ³ H/ ¹⁴ C	24.2	59.1	5.2	48.8	112.1	51.6
ACETATO ³ H/ ¹⁴ C	23.3	51.6	4.1	43.9	99.3	47.1
LACTONA ³ H/ ¹⁴ C	23.0	49.3	4.0	42.6	93.1	45.8

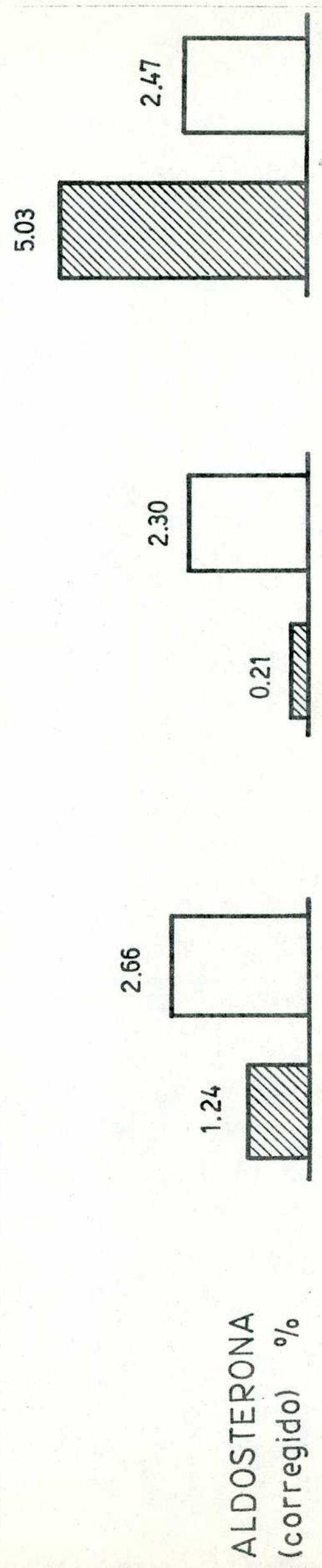


Fig. 35 : Relaciones ³H/¹⁴C y rendimientos de aldosterona y sus derivados a partir de la corticosterona y de la forma L de 18 OH B (R_M 4.33). C: controles químicos. Ø : controles biológicos. G: Incubados.

DISCUSION

En el presente trabajo se biosintetizaron y purificaron C-21 esteroides 18 hidroxilados radiactivos, se estudiaron sus propiedades químicas y bioquímicas y se elucidaron las estructuras de algunos de los compuestos derivados de los mismos que se forman "espontáneamente" en medios orgánicos (alcoholes) y acuosos acidificados. También se describe por primera vez la existencia de nuevos derivados formados en los medios descritos y se estudian algunas reacciones que convierten los esteroides 18 hidroxilados originales en tales derivados así como las reacciones inversas que regeneran los esteroides iniciales a partir de esos derivados.

Puesto que el estado de oxidación de C-18 en la 18 OH B es intermedio entre el CH₃ de igual posición en B y el aldehído correspondiente en aldosterona y teniendo en cuenta que el mejor precursor conocido de aldosterona es corticosterona, numerosos autores (126,149-153) han sugerido la posibilidad de que la 18 OH B sea el intermediario obligado de biosíntesis.

Sin embargo, todo estudio comparativo acerca de las capacidades precursoras de B y 18 OH B revela que ésta última es entre 1.5 y 80 veces menos efectiva que la primera (155,156).

Este hecho ha sido atribuido por varios grupos de investigadores (155, 156,159-160) dada la existencia de diferentes formas interconvertibles, a la supuesta capacidad precursora de biosíntesis del mineralocorticoide de alguna de estas llamadas "formas" y no del esteroide original.

Damasco y Lantos (145) informaron que la forma menos polar de 18 OH B obtenida por estacionamiento en metanol resultó ser mejor precursor que la más polar.

Todo esto justifica el estudio de los derivados o formas de 18 OH B. Si bien habían sido descritas dos "formas" de 18 OH B (145), análogamente a lo hallado por Dominguez (142) para 18 OH DOE, no se tenían datos suficientes - provenientes de estudios sistemáticos - acerca de las propiedades químicas, capacidad precursora relativa a B y estructura de tales "formas".

En este trabajo se comenzó por la búsqueda de condiciones que aseguraran la estabilidad de las formas aisladas.

Se halló que la forma M permanecía como tal en estado sólido (residuo seco) tal como fué descrito anteriormente (145) y también en medios acuosos neutros.

Por el contrario, el derivado R_M 4.33, proveniente de solución metanólica sólo se mantiene estable en ausencia absoluta de agua (bajo vacío y sobre Na metálico). El residuo proveniente de la evaporación de sus soluciones metanólicas con el tiempo se descompone (si no se toman estas precauciones) produciendo M, lo que muy probablemente se deba a la acción de la humedad atmosférica.

Para estimar la velocidad con la que estos procesos ocurren y además saber el tiempo necesario para obtener mediante ellos los derivados en cuestión, se estudió el curso de la reacción de transformación de M en R_M 4.33 en metanol hasta 8 días, hallándose una recta que alcanza al 40 % de R_M 4.33 en dicho lapso.

Sin embargo es seguro que a tiempos mayores la gráfica se aparta de la linealidad, como es de esperar, puesto que observaciones aisladas a tiempos mucho mayores (20-30 días) indican porcentajes de R_M 4.33 mucho menores que los que resultarían de extrapolar dicha recta.

Por el contrario, el estudio de la transformación de R_M 4.33 a M en agua, revela que esta reacción es mucho más rápida. La hipérbola correspondiente se ve en la figura 16.

Es llamativo que el compuesto o compuestos con igual movilidad cromatográfica que R_M 4.33 en Bush B_5 , pero proveniente de tratamiento de 18 OH B (M) con soluciones acuosas acidificadas (ClH 10^{-2} M) tiene propiedades químicas diferentes de R_M 4.33.

Este material, que denominamos R_M^* 4.33, que se forma muy rápidamente, no habiendo sido posible determinar por ello el curso de su reacción de formación. Además no sufre modificación alguna por ulterior tratamiento con agua y los estudios por espectrometría de masa indican una estructura diferente, a saber productos de deshidratación entre C-11 y C-18 dando el éter correspondiente (136,258-260), ó entre C-20 y C-21 el cual por un posterior reordenamiento daría el aldehído en C-21, ó más probablemente una mezcla de ambos.

En soluciones acuosas de $\text{ClH } 10^{-2} \text{ N}$ se observa además de $R_M^* 4.33$ la presencia de un compuesto ó compuestos con movilidad cromatográfica idéntica a la de M, en cantidad relativamente pequeña ($\geq 10 \%$). También se observan cantidades variables, que no superan en general el 20 %, de al menos otros 3 compuestos ($R_M 7.18, 6.34, 5.26$) en ese medio. Ninguna de estas sustancias parece variar su concentración en el lapso estudiado (figura 18).

En medios alcohólicos acidificados se observan no menos de 6 compuestos con R_M : 1.00, 1.84, 4.33, 5.26, 6.34, y 7.18. El compuesto ó compuestos con $R_M 1.84$ sólo se detecta en estos medios y no en $\text{ClH } 10^{-2} \text{ N}$ acuoso (figuras 19, 20 y 21).

Los compuestos con $R_M 4.33$, que denominamos genéricamente $R_M^{**} 4.33$ se forman muy rápidamente constituyendo ya a los 30 minutos un 40-45 % del total. A diferencia de lo observado en medios acuosos, su proporción relativa disminuye con el tiempo, tanto más rápidamente cuanto mayor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol (figuras 19, 20 y 21).

Con los datos obtenidos no es fácil interpretar la relación existente entre estos compuestos, especialmente por no disponerse de información acerca de la estructura e identidad de los mismos.

Los estudios de espectrometría de masa indicaron que la estructura de $R_M 4.33$ era la de un metoxiderivado en C-20.

Esta estructura fué confirmada con ensayos de doble marcación isotópica, los cuales mostraron incorporación de $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ en $^3\text{H-M}$ produciendo $^3\text{H-}^{14}\text{C-R}_M 4.33$, la cual perdía todo el ^{14}C al regenerar M por reacción con H_2O radioinerte.

Además, al reaccionar $^{14}\text{C-R}_M 4.33$ con $^3\text{H}_2\text{O}$, se produce $^3\text{H-}^{14}\text{C-M}$, el cual pierde todo el ^3H al convertirse en $R_M 4.33$ por reacción CH_3OH radioinerte (tabla II).

Ya avanzado este trabajo, Roy y col (148) demostraron mediante espectrometría de masa e infrarrojo, la producción de un metoxi y etoxi-derivado en C-20, del 21-acetato de 18 OH DOC, por reacción con CH_3OH y $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ respectivamente.

Los estudios por espectrometría de masa llevados a cabo por estos investigadores fueron realizados tanto por ionización química como

por impacto electrónico; para ésta última técnica no aclaran las condiciones experimentales utilizadas y mencionan sólo que no pudieron detectar el ión molecular.

En nuestro trabajo, los espectros de masa de los compuestos obtenidos por tratamiento con CH_3OH de 18 OH Progesterona (Compuesto II) y 18 OH DOC (Compuesto Y) indican también la existencia de metoxiderivados en C-20 para ambos esteroides 18 hidroxilados (ver figuras 28 y 34).

Por otra parte los estudios correspondientes a los compuestos obtenidos por tratamiento con $\text{ClH } 10^{-2} \text{ N}$ de 18 OH B sugieren que se trataría de productos de deshidratación entre C-11 y C-18 ó bien entre C-20 y C-21 (ver figura 24).

Es sabido que los 11β , 18 dioles son sumamente sensibles al tratamiento con soluciones acuosas ácidas, transformándose en los 11β -18 éteres correspondientes (136,258-260).

También en el caso de la aldosterona se ha propuesto la estructura 11β -18 éter como la forma tautomérica de este compuesto que se supone predominaría en soluciones acuosas, especialmente a la temperatura de los animales homeotermos (143). Los otros dos tautómeros serían la llamada forma abierta y la doblemente ciclada (C-11,C-18) y (C-18,C-20).

En cuanto a 18 OH Progesterona, el tratamiento con soluciones acuosas de $\text{ClH } 10^{-2} \text{ N}$ dió origen a dos compuestos: Compuesto III y Compuesto IV cuyas estructuras corresponderían a productos de deshidratación del esteroide madre entre C-20 y C-21 para el primero y entre C-17 y C-20 para el segundo (ver figuras 31 y 32).

Ambos derivados de 18 OH Progesterona, a pesar de su analogía se separan, no por polaridad sino por diferencia de adsorción en placa delgada.

La única técnica disponible para los derivados correspondientes de 18 OH B, no permite separar los productos de deshidratación en este caso por tratarse de una cromatografía de partición (sistema Bush B₅).

Una situación análoga podría presentarse eventualmente en el caso de los derivados obtenidos en medio ácido a partir de 18 OH DOC por-

que la técnica analítica, cromatografía en el sistema TPG, se basa también en la partición. No obstante, en este caso no puede existir la estructura 11 β -18 éter, porque el compuesto original no posee OH en C-11. Quedaría entonces como más probable la existencia de un producto de deshidratación entre C-20 y C-21.

La deshidratación entre C-20 y C-17, parece bastante improbable, tanto por analogía con lo observado con el derivado análogo de 18 OH B como por lo sugerido por los picos observados en su propio espectro.

La estructura propuesta para R_M 4.33 de 18 OH B en base a los estudios por espectrometría de masa de este compuesto y del M correspondiente fué confirmada por medio de la técnica de doble marcación. Se comprobó la incorporación de $^{14}CH_3OH$ a ^3H-M 18 OH B en una relación molar de 0.85 como se muestra en la tabla II.

Este valor, algo inferior a 1, puede atribuirse a descomposición parcial de $^3H-^{14}C$ R_M 4.33 con pérdida de $^{14}CH_3OH$ por efecto de la humedad ambiente en las manipulaciones indispensables para la determinación ó bien a la presencia eventual de otras sustancias en menores cantidades en la preparación que sin embargo no fueron separables por cromatografía en el sistema Bush B₅ ni diferenciables por las técnicas de espectrometría de masa empleadas. Esta última posibilidad, la existencia de una mezcla, parecería mucho menos probable que la primera, dada la ya mencionada labilidad del compuesto frente a trazas de humedad.

La reversión de este compuesto en agua radioinerte produce M exento totalmente de ^{14}C como se observa en la tabla II.

Por otra parte se demostró la reacción de 3H_2O con $^{14}C-R_M$ 4.33, como se muestra en la tabla II, obteniéndose una relación molar correspondiente a 0.92 moles de 3H_2O por mol de esteroide.

La estructura de metoxiderivado en C-20 atribuida a R_M 4.33 debería teóricamente dar una relación molar igual a 1, correspondiente a la hidrólisis de una unión hemiacetálica. Si la estructura fuese la de un producto de condensación de 2 moléculas de esteroide según ha sido propuesto por varios autores (127) ese valor debería ser el doble por involucrar la ruptura de dos uniones.

El valor cercano a la unidad tal como hemos observado experimentalmente, no puede por sí solo diferenciar entre una ruptura de la unión hemiacetálica en C-20 correspondiente al metoxiderivado y la eventual ruptura hidrolítica de un producto de condensación diferente a la propuesta (127) que implicara una sola unión. Sin embargo los resultados obtenidos en los estudios realizados por espectrometría de masa y en los ensayos con $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ demuestran la existencia de un metoxiderivado.

Corresponde señalar que en los estudios por espectrometría de masa de todos los compuestos analizados se sugiere en forma tentativa las diferentes estructuras así como la asignación propuesta para los iones de diferente m/e, teniendo en cuenta que debería haberse trabajado con compuestos marcados para poder caracterizar los iones de m/e indicados en los espectros, pudiendo de esta manera asegurar el esquema de fragmentación o la racionalización indicada para cada compuesto.

En cuanto a la capacidad precursora de aldosterona se observó al incubar B y R_M^* 4.33 , la formación incluso abiótica de un material radioactivo con propiedades análogas a las de la d (+) aldosterona. Dicho material migra en el sistema Bush B_5 con la misma movilidad que ésta. Su derivado acetilado lo hace como el diacetato de d (+) aldosterona en un segundo sistema cromatográfico y el producto de oxidación de éste se comporta como la lactona del 21-monoacetato de aldosterona en un tercer sistema.

La constancia en la relación $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ obtenida en los dos últimos (ver figura 35) y las coincidencias antes mencionadas sugeriría que el producto de conversión espontánea sería análogo a alguno de los tres tautómeros de la aldosterona o a una mezcla de éstos.

Es muy improbable que la 17 isoaldosterona o sus tautómeros estuvieran presentes en la mezcla ya que el material del cual se partió en ambos casos poseía la cadena lateral en β y no en α .

Por otra parte se logró separar 17 isoaldosterona de aldosterona en el sistema Bush B_5 , siendo la primera ligeramente más polar.

La elucidación definitiva mediante métodos físicos de la estructura del producto obtenido como sugieren Brooks y col (266) requeri-

ría disponer de una masa del compuesto del orden del miligramo. Además sería necesario determinar su actividad, acción mineralocorticoide, mediante ensayos biológicos.

Como puede verse en la figura 35 tanto B como $R_M^* 4.33$ producen el compuesto descrito. Como era de esperar, B fué buen sustrato, aunque también se transformó en forma espontánea en el compuesto antes mencionado, siendo esta última reacción cuantitativamente menos importante que la enzimática.

Por otra parte el agregado de extracto hervido al medio de incubación anula la conversión espontánea. Es probable que en los llamados controles biológicos esté presente un factor termoestable que inhiba su oxidación química a aldosterona.

No ha sido posible aún determinar si ese factor existe también en las preparaciones biológicas.

La eficiencia de $R_M^* 4.33$ como precursor en los controles y en los incubados fué similar. Esto parecería indicar que $R_M^* 4.33$ se transforma sólo espontáneamente en aldosterona. Para tal conversión $R_M^* 4.33$ fué más eficiente que B y el agregado de extracto hervido no afectó en este caso la transformación.

Damasco y Lantos (145) encontraron que una de las formas menos polares de 18 OH B era un buen precursor biológico de aldosterona. La forma de 18 OH B, $R_M^* 4.33$ utilizada en nuestros ensayos posee la misma movilidad cromatográfica que la empleada por estos autores, pero su estructura molecular es distinta, como ya ha sido descrito en este trabajo.

De cualquier modo los resultados obtenidos ponen en evidencia la importancia de las " formas menos polares " de la 18 OH B como posibles precursores del principal mineralocorticoide conocido.

La aldosterona es una hormona vital que ejerce su acción aún a muy bajos niveles y la 18 oxigenación es una propiedad de las adrenales de los vertebrados que se adquiere tempranamente en su evolución (265).

RESUMEN

1. Se describen los métodos de aislamiento, caracterización y purificación de las distintas formas o derivados de 18 OH B.
2. Se estudia la reacción de conversión de la forma más polar a la menos polar en metanol.
3. Se hallaron condiciones bajo las cuales éstas son estables.
4. Se estudió la reacción de conversión de la forma menos polar en la más polar en agua.
5. Se ensayaron interconversiones en distintos solventes orgánicos.
6. Se determinó la concentración óptima de ClH para obtener formas menos polares en soluciones acuosas.
7. Se describe la aparición de numerosas formas menos polares, en medios orgánicos y acuosos acidificados.
8. Se estudió la formación de los derivados arriba mencionados.
9. Por espectrometría de masa por impacto electrónico se determinó la estructura de diversas formas menos polares encontrándose un metoxiderivado para la forma menos polar obtenida en metanol y un producto de deshidratación para la obtenida en medio acuoso acidificado.
10. Utilizando técnicas de marcación doble se demostró la incorporación de $^3\text{H}_2\text{O}$ en la forma más polar de 18 OH B y la incorporación de $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ en la forma menos polar producida en este alcohol.

11. Se estudiaron las capacidades precursoras de aldosterona de varias formas de 18 OH B respecto de la de corticosterona.
12. Se estudió la interconversión entre la forma menos polar obtenida en medios acuosos acidificados y el compuesto polar que la origina.
13. Con el objeto de intentar elucidar un esquema general de propiedades de esteroides 18 hidroxilados, se realizaron estudios de obtención de derivados de otros compuestos análogos, como 18 OH Progesterona y 18 OH Desoxicorticosterona, y se los comparó con los de 18 OH B.
14. Se determinó por espectrometría de masa por impacto electrónico la estructura de varias formas menos polares de 18 OH Progesterona y 18 OH Desoxicorticosterona.

BIBLIOGRAFIA

1. B.A. Houssay y J.T. Lewis, *Amer. Jour. Physiol.*, LXIV, 512 (1923).
2. J.M. Rogoff y G.N. Stewart, *Science*, 66, 327 (1927).
3. W.W. Swingle y J.J. Pfiffner, *Science*, 71, 321 (1930).
4. J.J. Pfiffner, O. Wintersteiner y H.M. Vars, *J. Biol. Chem.*, 111, 585 (1935)
5. O. Wintersteiner y J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.*, 111, 599 (1935).
6. O. Wintersteiner y J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.*, 116, 291 (1936).
7. H.L. Mason, C.S. Myers y E.C. Kendall, *J. Biol. Chem.*, 114, 613 (1936).
8. H.L. Mason, C.S. Myers y E.C. Kendall, *J. Biol. Chem.*, 116, 267 (1936).
9. D.J. Ingle, *Am. J. Physiol.*, 116, 622 (1936).
10. G.F. Cartland y M.H. Kuizenga, *J. Biol. Chem.*, 116, 57 (1936).
11. D.J. Ingle, *Endocrinology*, 34, 191 (1944).
12. M.H. Kuizenga, A.W. Wick, D.J. Ingle, J.W. Nelson y G.F. Cartland, *J. Biol. Chem.*, 147, 561 (1943).
13. H.A. Bern, *Science*, N.Y., 158, 455 (1967).
14. J.D. Baxter y P.H. Forsham, *The American Journal of Medicine*, 53, 573 (1972).
15. J. Trémolieres, R. Derache y G. Griffaton, *Ann. Endocrinol.*, 15, 694 (1954).
16. J.D. Baxter, A.W. Harris, G.M. Tomkins y M. Cohn, *Science*, 171, 189 (1971).
17. C.L. Cope, *Adrenal Steroids and Disease*, Philadelphia, J.B. Lippincott Co. (1972).
18. J.J. Cohen y H.N. Claman, *J. Exp. Med.*, 133, 1026 (1971).
19. M.A. Levine y H.N. Claman, *Science*, 167, 1515 (1970).
20. Williams, *Textbook of Endocrinology*, W.B. Saunders Co. Philadelphia y London, 308 (1962).
21. A.F. de Nicola y V. Dahl, *Endocrinology*, 89, 1236 (1971).
22. G.H.W. Lucas, *Amer. J. Physiol.*, 77, 114 (1926).
23. E.J. Baumann y J. Kurland, *J. Biol. Chem.*, 71, 281 (1927).
24. R.F. Loeb, D.W. Atchley, F.M. Benedict y L. Leland, *J. Exp. Med.*, 57, 775 (1933).
25. G.A. Harrop, W.M. Nicholson y M. Strauss, *J. Exp. Med.*, 64, 233 (1936).
26. G.W. Thorn, H.R. Garbutt, F.A. Hitchcock y F.A. Hartman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 35, 247 (1936).

27. T. Reichstein y J. von Euw, *Helv*, 21, 1197 (1938).
28. M. Steiger y T. Reichstein, *Helv*, 20, 1164 (1937).
29. S. A. Simpson y J. F. Tait, *Endocrinology*, 50, 150 (1952).
30. S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euw y T. Reichstein *Experientia*, 9, 333 (1953).
31. V. R. Mattox, H. L. Mason, A. Alberty y C. F. Code, *Am. Soc.*, 75, 4869 (1953).
32. S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euw, O. Schindler y T. Reichstein, *Experientia*, 10, 132 (1954).
33. S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euw, O. Schindler y T. Reichstein, *Helv*, 37, 1200 (1954).
34. F. J. Ross, *Aldosterone in Clinical and Experimental Medicine*, Oxford, Blackwell Scientific Publications (1959).
35. J. Crabbé, *The Sodium-Retaining Action of Aldosterone*, Brussels, Editions Arscia S.A.
36. G. A. Porter y I. S. Edelman, *J. Clin. Invest.*, 43, 611 (1964).
37. G. W. G. Sharp y A. Leaf, *Nature*, 202, 1185 (1964).
38. H. H. Ussing y K. Zerahn, *Acta Physiol Scand*, 23, 110 (1951).
39. H. Carstensen, A. C. J. Burgers y C. H. Li, *Gen. Comp. Endocr.*, 1, 37 (1961).
40. F. Morel y J. Maetz, *J. Med. Bordeaux* 13 (1958).
41. B. T. Scheer, M. W. Mumbach y B. L. Cox, *Fed. Proc.*, 20, 177 (1961).
42. W. R. Bishop, M. W. Mumbach y B. T. Scheer, *Am. J. Physiol.*, 200, 451 (1961).
43. A. C. Barger, R. D. Berlin y J. F. Tulenko, *Endocrinology*, 62, 804 (1958).
44. H. G. Williams-Ashman, *Cancer Res.*, 25, 1096 (1965).
45. I. S. Edelman, R. Bogoroch y G. A. Porter, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 50, 1169 (1963).
46. H. E. Williamson, *Biochem. Pharmacol.*, 12, 1449 (1963).
47. D. D. Fanestil y I. S. Edelman, *Fed. Proc.*, 25, 912 (1966).
48. V. Koefoed-Johnsen y H. H. Ussing, *Acta Physiol. Scand.*, 42, 298 (1958).
49. H. S. Frazier, *J. Gen. Physiol.* 45, 515 (1962).
50. J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 314 (1962).
51. N. S. Bricker, T. Biber y H. H. Ussing, *J. Clin. Invest.*, 42, 88 (1963).
52. J. C. Skou, *Physiol. Rev.*, 45, 596 (1965).
53. S. L. Bonting y M. R. Canady, *Amer. J. Physiol.*, 207, 1005 (1964).
54. C. F. Chignell, P. M. Roddy y E. O. Titus, *Life Sci.*, 4, 559 (1965).
55. I. D. K. Halkerston, J. Eichhorn y O. Hechter, *J. Biol. Chem.*, 236, 374 (1961)

56. K. Shimizu, R. I. Dorfman y M. Gut, *J. Biol. Chem* 235, PC25 (1960).
57. K. Shimizu, M. Hayano, M. Gut y R. I. Dorfman, *J. Biol. Chem*, 236, 695 (1961).
58. G. Constantopoulos y T. T. Tchen, *J. Biol. Chem*, 236, 65 (1968).
59. S. Ichii, E. Forchielli y R. I. Dorfman, *Steroids*, 2, 63 (1963).
60. D. Toren, K. M. J. Menon, E. Forchielli y R. I. Dorfman, *Steroids*, 3, 381 (1964).
61. K. M. J. Menon, M. Drosdowsky, R. I. Dorfman y E. Forchielli, *Steroids Suppl. I*, 95 (1965).
62. G. Morrison, R. A. Meigs y K. J. Ryan, *Steroids Suppl II*, 177 (1961).
63. S. Solomon, P. Levitan y S. Lieberman, *Rev. Canad. Biol*, 15, 282 (1956).
64. K. Shimizu, M. Hayano, M. Gut y R. I. Dorfman, *J. Biol. Chem*, 236, 695 (1961).
65. K. Shimizu, M. Gut y R. I. Dorfman, *J. Biol. Chem*, 237, 699 (1962).
66. G. Constantopoulos, P. Satoh y T. T. Tchen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8, 50 (1962).
67. R. I. Dorfman, E. Forchielli, S. Ichii y J. Kowal, *Excerpta Medica International Congress N° 83*, 1087 (1964).
68. G. Constantopoulos y T. T. Tchen, *J. Biol. Chem*, 236, 65 (1961).
69. A. C. Chaudhuri, Y. Harada, K. Shimizu, M. Gut y R. I. Dorfman, *J. Biol. Chem* 237, 703 (1962).
70. P. S. Satoh, G. Constantopoulos y T. T. Tchen, *Biochemistry (Wash)* 5, 1646 (1966).
71. M. Nakamura, T. Kimura y K. Suzuki, *J. Jap. Biochem. Soc*, 35, 25 (1963).
72. B. W. Harding y D. H. Nelson, *Endocrinology*, 75, 501 (1964).
73. N. Saba, O. Hechter y D. Stone, *J. Am. Chem. Soc*, 76, 3862 (1954).
74. M. Saffran y M. J. Bayliss, *Endocrinology*, 52, 140 (1953).
75. D. Stone y O. Hechter, *Arch. Biochem*, 51, 457 (1954).
76. S. Koritz, *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 63 (1962).
77. N. Saba y O. Hechter, *Fed. Proc*, 14, 775 (1955).
78. M. Hayano, N. Saba, R. I. Dorfman y O. Hechter, *Recent. Progress in Hormone Research*, 12, 79 (1956).
79. W. S. Lynn (Jr), E. Staple y S. Gurin, *J. Amer. Chem. Soc*, 76, 4048 (1954).
80. K. Bloch, *J. Biol. Chem*, 157, 661 (1945).
81. K. F. Beyer y L. T. Samuels, *J. Biol. Chem*, 219, 69 (1956).
82. M. Shikita y P. F. Hall, *Biochim. Biophys. Acta*, 136, 484 (1967).
83. A. S. Goldman, A. M. Bongiovanni, W. C. Yakovac y A. Prader, *J. Clin. Endocrinol*, v 24, 894 (1964).

84. G.O. Potts, G.F. Burnam y A.L. Beyler, Fed. Proc. v22, 166 (1963).
85. A.S. Goldman, A.M. Bongiovanni y W.C. Yakovac, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med, 121, 757 (1966).
86. J.G. Phillips y I. Chester Jones, J. Endocr., 16, iii (1957).
87. H. Levy, R.W. Jeanloz, R.P. Jacobsen, O. Hechter, V. Schenker y G. Pincus, J. Biol. Chem, 211, 867 (1954).
88. M. Hayano y R.I. Dorfman, Arch. Biochem. Biophys, 36, 237 (1952).
89. J.E. Plager y L.T. Samuels, Arch. Biochem. Biophys, 42, 477 (1953).
90. J.E. Plager y L.T. Samuels, J. Biol. Chem, 211, 21 (1954).
91. K.J. Ryan y L.L. Engel, J. Am. Chem. Soc, 78, 2654 (1956).
92. K.J. Ryan y L.L. Engel, J. Biol. Chem, 225, 103 (1957).
93. H.S. Mason, Advances Enzym., 19, 79 (1957).
94. S. Narasimhulu, D.Y. Cooper y O. Rosenthal, Abstracts of 140th Meeting of the American Chemical Society 63C, N° 153 (1961).
95. M. Klingenberg, Arch. Biochem. Biophys, 75, 376 (1958).
96. D. Garfinkel, Arch. Biochem. Biophys, 77, 493 (1958).
97. T. Omura y R. Sato, J. Biol. Chem, 239, 2370 (1964).
98. T. Omura y R. Sato, J. Biol. Chem, 239, 2379 (1964).
99. M.L. Sweat, J. Amer. Chem. Soc, 73, 4056 (1951).
100. M. Hayano, R.I. Dorfman y E.Y. Yamada, J. Biol. Chem, 193, 175 (1951).
101. M. Hayano y R.I. Dorfman, J. Biol. Chem, 201, 175 (1953).
102. F.W. Kahnt y A. Wettstein, Helv. Chim. Acta, 34, 1790 (1951).
103. A.C. Brownie y J.K. Grant, Biochem J., 57, 255 (1954).
104. M. Hayano y R.I. Dorfman, J. Biol. Chem, 211, 227 (1954).
105. M. Hayano, M.C. Lindberg, R.I. Dorfman, J.E.H. Hancock y W. von E. Doering Arch. Biochem, 59, 529 (1955).
106. M.L. Sweat y M.D. Lipscomb, J. Amer. Chem. Soc, 77, 5185 (1955).
107. J.K. Grant, Biochem J, 64, 559 (1956).
108. B.B. Brodie, J. Axelrod, J.R. Cooper, L. Gaudette, B.N. La-Du, C. Mitoma y S. Udenfriend, Science, 121, 603 (1955).
109. B.W. Harding, S.H. Wong y D.H. Nelson, Biochim. Biophys. Acta, 92, 415 (1964).
110. L.D. Wilson, D.H. Nelson y B.W. Harding, Biochim. Biophys. Acta, 99, 391 (1965).
111. D.Y. Cooper, S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal y R.W. Estabrook, Science, 147, 400 (1965).

112. D.Y. Cooper, S. Narasimhulu, A. Slade, W. Raich, O. Foroff y O. Rosenthal, *Life Sci*, 4, 2109 (1965).
113. B.W. Harding, L.D. Wilson, S.H. Wong y D.H. Nelson, *Steroids Suppl II*, 51 (1965).
114. W.D. Belt y D.C. Pease, *J. Biophys. Biochem. Cytol* 2:4 Suppl. 369 (1956).
115. D.D. Sabatini y E.D.P. de Robertis, *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 9, 105 (1961).
116. S. Ulick y S. Lieberman, *J. Amer. Chem. Soc*, 79, 6567 (1957).
117. S. Ulick y K.K. Vetter, *J. Biol. Chem*, 237, 3364 (1962).
118. S. Ulick, E. Gauthier, K.K. Vetter, J.R. Markello, S. Yaffe y C.V. Lowe, *J. Clin. Endocr. Metab*, 24, 669 (1964).
119. S. Ulick, G.L. Nicolis, K.K. Vetter, in *Aldosterone*, ed. E.E. Baulie y E. Robel, Blackwell: Oxford 5 (1964).
120. S. Ulick y K. Kush, *J. Amer. Chem. Soc*, 82, 6421 (1960).
121. R. Neher y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 43, 623 (1960).
122. P.J. Ward y M.K. Birmingham, *Biochem J*, 76, 269 (1960).
123. F. Péron, *Endocrinology*, 66, 458 (1960).
124. F. Péron, *Endocrinology*, 69, 39 (1961).
125. P.B. Kaman, R. Ertel y F. Ungar, *Endocrinology*, 74, 865 (1964).
126. T. Sandor y A. Lanthier, *Acta Endocr*, 42, 355 (1963).
127. H. Levi, D.I. Cargill, H.C. Chung, B. Hood y J.J. Carlo, *Steroids*, 5, 131 (1965).
128. E. Marusic y P. Mulrow, *Endocrinology*, 80, 214 (1967).
129. T. Sandor, J. Lamoureux y A. Lanthier, *Endocrinology*, 73, 629 (1963).
130. T. Sandor y A. Lanthier, *Biochim. Biophys. Acta*, 74, 756 (1963).
131. C.R.W. Edwards, E.G. Biglieri, I.V. Martin, A.A. Tugh y F.C. Baxter, *J. End.* 63, 29 (1974).
132. E. Pedernera y C.P. Lantos, *Gen. Comp. Endocr*, 20, 331 (1973).
133. M. Borrueal, P. Borrueal, M.C. Damasco y C.P. Lantos, *Gen. Comp. Endocr*, 22, 1 (1974).
134. Y. Touiton, A. Bogdan, J.C. Legrand y P. Desgrez, *Acta Endocr*, 80, 517 (1975).
135. A. Wilson, P.A. Mason y R. Fraser, *J. Steroid Biochem*, 7, 611 (1976).
136. J. Schmidlin y A. Wettstein, *Helv. Chimica Acta*, 44, 1596 (1961).
137. M. Prost y R.F. Maume, *J. Steroid Biochem*, 5, 133 (1974).

138. P. Génard, M. Palem Vlies, P. Coninx, M. Margoulies, F. Compernelle y M. Vanderwalle, *Steroids*, 12, 763 (1968).
139. F. W. Kahnt, R. Neher y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 38, 1237 (1955).
140. M. K. Birmingham y P. J. Ward, *J. Biol. Chem.*, 236, 1661 (1961).
141. M. K. Birmingham, H. Traikov y P. J. Ward, *Steroids*, 1, 463 (1963).
142. O. V. Dominguez, *Steroids Suppl* 2, 29 (1965).
143. P. Génard, M. Palem Vlies, C. Denoel, H. Van Cauwenberge y D. Echauten, *J. Steroid Biochem*, 6, 201 (1975).
144. A. Wettstein, *Experientia*, 17, 329 (1961).
145. M. C. Damasco y C. P. Lantos, *J. Steroid Biochem*, 6, 69 (1975).
146. Dr. Kirk, in *Instructions from the Medical Research Council, Steroid Reference Collection*.
147. Radiochemical Centre, Amersham, U.K.
148. A. K. Roy, L. C. Ramirez y S. Ulick, *J. Steroid Biochem*, 7, 81 (1976).
149. P. J. Mulrow y G. L. Cohn, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101, 731 (1959).
150. W. W. Davis, L. R. Burwel, A. G. T. Casper y F. C. Bartler, *J. Clin. Invest.*, 47, 1425 (1968).
151. J. Müller, *Acta Endocr*, 52, 515 (1966).
152. G. Nicolis y S. Ulick, *Endocrinology*, 76, 514 (1965).
153. E. M. Donaldson y W. N. Holmes, *J. Endocr*, 32, 329 (1965).
154. P. Vecsei, D. Lommer y H. P. Wolff, *Experientia*, 24, 1199 (1968).
155. P. B. Paman, D. C. Sharma y R. I. Dorfman, *Biochemistry*, 5, 1795 (1966).
156. J. Müller, *Regulation of Aldosterone Biosynthesis*, Springer-Verlog, Heidelberg (1971).
157. O. Rosenthal y S. Narashimhulu, *Methods in Enzymology*, 15, 614 (1969).
158. G. P. Vinson y B. Whitehouse, *Acta Endocr*, 72, 746 (1973).
159. J. R. Pasqualini, *Nature*, 201, 501 (1964).
160. E. T. Marusic, A. White y A. R. Aedo, *Arch. Biochim. Biophys*, 157, 320 (1973).
161. H. Sheppard, R. Swenson y T. F. Mowles, *Endocrinology*, 73, 819 (1963).
162. C. J. P. Giroud y J. Stachenko, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92, 154 (1956).
163. J. Stachenko y C. J. P. Giroud, *Can. J. Biochem*, 42, 1777 (1964).
164. S. Psychoyos, H. H. Tallan y P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 241, 2949 (1966).
165. B. V. Tamasastri y R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.*, 239, 106 (1964).
166. H. H. Tallan, S. Psychoyos y P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 242, 1912 (1967).
167. F. W. Kahnt y R. Neher, *Helv. Chim. Acta*, 48, 1457 (1965).

168. B. Aupetit, F. Aubry-Marais y J. C. Legrand, *Biochimie*, 59, 311 (1977).
169. G. Rosenfeld, E. Rosenberg, F. Ungar y R. I. Dorfman, *Endocrinology*, 58, 255 (1956).
170. J. Müller, *Acta Endocr*, 48, 283 (1965).
171. J. Müller, *Acta Endocr*, 50, 301 (1965).
172. D. C. Sharma, C. A. Neremberg y R. I. Dorfman, *Biochemistry*, 6, 3472 (1967).
173. F. T. Marusic y P. J. Mulrow, *J. Clin. Invest*, 46, 2101 (1967).
174. J. F. Tait, S. A. S. Tait, R. P. Gould y M. S. R. Mee, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 185, 375 (1974).
175. G. H. Williams, L. M. Mc Donnall, M. A. Raux y N. K. Hollenberg, *Circulation Research*, 34, 384 (1974).
176. J. R. Blair-West, J. P. Coghlan, D. A. Denton, J. R. Godin, M. Wintour y R. D. Wright, *Rec. Progr. Hormone Res*, 19, 311 (1963).
177. J. O. Davis, J. Urquhart y J. T. Higgins, *J. Clin. Invest*, 42, 597 (1963).
178. K. Baumann y J. Müller, *Acta Endocr*, 69, 701 (1972).
179. J. F. Tait y S. A. S. Tait, *J. Steroid Biochem*, 7, 687 (1976).
180. P. Fredlund, S. Saltman y K. Catt, *Endocrinology*, 97, 1577 (1975).
181. J. K. Blair-West, A. Brodie, J. P. Coghlan, D. A. Denton, C. Flood, J. R. Goding, B. A. Scoggins, J. F. Tait, S. A. S. Tait, E. M. Wintour y R. D. Wright, *J. Endocr*, 46, 453 (1970).
182. F. A. Mendelsohn y C. Mackie, *Clin. Sci. Mol. Med*, 49, 13 (1975).
183. K. S. Szalay, E. Bacsy y E. Stark, *Acta Endocr*, 80, 114 (1975).
184. B. Gláz y P. Vecsei, *Aldosterone*, Pergamon Press, Oxford, 78 (1971).
185. L. D. Garren, G. N. Gill, H. Masui y G. M. Wallon, *Recent. Progr. Hormone Research*, 27, 433 (1971).
186. E. J. Ross, *Aldosterone and aldosteronism*, Lloyd-Luke, London (1975).
187. D. Schulster, S. Burstein y B. A. Cooke, *Molecular Endocrinology of the Steroids Hormones*, J. Wiley & Sons, London, 208 (1976).
188. J. K. Blair-west, J. P. Coghlan, D. A. Denton y B. A. Scoggins. In *Angiotensin*, edit. I. H. Page y F. M. Bumpus, Springer-Verlag, Heidelberg, 337 (1974).
189. D. Stone y O. Heckter, *Arch. Biochem*, 51, 457 (1954).
190. G. Karaboyas y S. B. Koritz, *Biochemistry*, 4, 462 (1965).
191. A. F. De Nicola, *J. Steroid Biochem*, 6, 1219 (1975).
192. C. P. Lantos, M. K. Birmingham y H. Traikov, *Acta Physiol. Latino Americana*, 17, 42 (1967).

193. J. I. Kitay, M. D. Coyne, N. H. Swygert y K. G. Gaines, *Endocrinology*, 89, 565 (1971).
194. C. P. Lantos, V. Dahl, J. R. Cordero Funes y A. F. De Nicola, *Acta Physiologica Latino Americana*, 23, 277 (1973).
195. K. Asano y B. W. Harding, *Endocrinology*, 99, 977 (1976).
196. D. G. Graham-Smith, R. W. Butcher, K. L. Ney y E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.*, 242, 5535 (1967).
197. T. H. Whittey, N. W. Stowe, S. H. Ong, R. L. Ney y A. L. Steiner, *J. Clin. Invest.*, 56, 146 (1975).
198. L. Manuelladis y P. J. Mulrow, *Endocrinology*, 95, 728 (1974).
199. G. H. Williams, L. M. Mc Donnell, S. A. S. Tait y J. F. Tait, *Endocrinology*, 91, 948 (1972).
200. K. Bauman y J. Müller, *Acta Endocr.*, 76, 102 (1974).
201. J. E. Boyd, R. B. Page y P. J. Mulrow, *Endocrinology*, 90, 827 (1972).
202. G. P. Vinson y B. Whitehouse, *Acta Endocr.*, 72, 737 (1973).
203. T. L. Goodfriend y S. Y. Lin, *Circulation Research*, 26, 27 Suppl 1, 163 (1970).
204. P. F. Bing y D. Schulster, *J. Endocr.*, 74, 261 (1977).
205. A. Petyremann, R. D. Brown, W. E. Nicholson, D. P. Island, G. W. Liddle y J. G. Hardman, *Steroids*, 24, 451 (1974).
206. J. G. Mc Dougall, J. P. Coghlan, E. E. Mc Garry y B. A. Scoggins, *J. Steroid Biochem.*, 7, 421 (1976).
207. R. Haning, S. A. S. Tait y J. F. Tait, *Endocrinology*, 87, 1147 (1970).
208. N. M. Kaplan, *J. Clin. Invest.*, 44, 2029 (1965).
209. P. A. Mason, J. C. Buckingham, P. F. Semple y R. Fraser, *J. Endocr.*, 72, 3 (1977).
210. S. S. Rajyis y R. Horton, *J. Clin. Endocr. Metab.*, 32, 539 (1971).
211. P. A. Mason, R. Fraser, J. J. Morton, P. F. Semple y A. Wilson, *J. Steroid Biochem.*, 7, 859 (1976).
212. M. Lebel y J. H. Grose, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 51, 335 (1976).
213. G. Aguilera y E. T. Marusic, *Endocrinology*, 89, 1524 (1971).
214. G. Aguilera, A. White y E. T. Marusic, *Acta Endocr.*, 80, 104 (1975).
215. W. B. Campbell, S. N. Brooks y W. A. Pettinger, *Science*, 184, 994 (1974).
216. C. A. Sarstedt, E. D. Vaughan y M. J. Peach, *Circulation Research*, 37, 350 (1975).

217. J.R. Blair-West, J.P. Coghlan, D.A. Denton, J.W. Funder, B.A. Scoggins y R.D. Wright, *J. Clin. Endocr. Metab*, 32, 575 (1971).
218. T. Kono, F. Oscko, S. Shimpo, M. Nanno y J. Endo, *J. Clin. Endocr. Metab*, 41, 1174 (1976).
219. T.H. Whitley, N.W. Stone, S.H. Ong, R.L. Ney y A.L. Steiber, *J. Clin. Invest*, 56, 146 (1975).
220. T. Omura, K. Sato, D.Y. Cooper, O. Rosenthal y R.W. Estabrook, *Fed. Proc.*, 24, 1181 (1965).
221. R.W. Estabrook, D.Y. Cooper y O. Rosenthal, *Biochem. Z.*, 338, 741 (1963).
222. P. Greengard, S. Psychoyos, H.H. Tallan, D.Y. Cooper y O. Rosenthal, *Arch. Biochem. Biophys*, 121, 298 (1967).
223. A. Lanthier y T. Sandor, *Can. J. Physiol. Biochem*, 51, 776 (1973).
224. M.C. Damasco, F. Díaz y C.P. Lantos, trabajo a publicar.
225. C.H.L. Shackleton, J.W. Honour, M. Dillon y P. Milla, *Acta Endocr*, 81, 762 (1976).
226. H.K.A. Visser y W.S. Cost, *Acta Endocr*, 47, 589 (1964).
227. W. Hamilton, A.G. McCandless, J.T. Ireland y C.G. Gray, *Arch. Dis. Childhood*, 51, 576 (1976).
228. S. Ulick, *J. Clin. Endocr. Metab*, 43, 92 (1976).
229. C.H.L. Shackleton y J.W. Honour, *J. Steroid. Biochem*, 8, 199 (1977).
230. A. Zaffaroni y R.B. Burton, *J. Biol. Chem*, 193, 749 (1951).
231. J.E. Bush, *Biochem. J.*, 50, 370 (1952).
232. B. Klinan y R.E. Peterson, *J. Biol. Chem*, 235, 1639 (1960).
233. C.P. Lantos, P.B. Raman, J.M.H. Graves, R.I. Dorfman y E. Forchielli, *Steroids*, 6, 69 (1965).
234. Packard Instrument Company, Technical Bulletin.
235. J.D. Davidson y P. Feigelson, *P. Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 2, 13, (1957).
236. L.A. Baillie, *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 8, 1 (1960).
237. G.A. Bruno y J. Christian, *J. E. Analyt. Chem*, 33, 650 (1961).
238. E.T. Bush, *Analyt. Chem*, 35, 1024 (1963).
239. T. Higashimura, O. Yamada, N. Nohara y T. Shidei, *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 13, 308 (1962).
240. D.L. Horrocks, *Rev. Scient. Instrum*, 35, 334 (1964).
241. D.L. Horrocks, *Nature, Lond*, 202, 78 (1964).

242. R. De Wachter y W. Fiers, *Analyt. Biochem*, 18, 351 (1967).
243. R. J. Herberg, Channels Ratio Method of Quench Correction, in *Liquid Scintillation Counting in Packard Technical Bulletin* N° 15 (1965).
244. Y. Kobayashi y D. W. Maudsley, in "The Current Status of Liquid Scintillation Counting", ed. E. D. Bransone(h), Grune & Stratton, 76, Ney York (1970).
245. Y. Kobayashi y D. V. Maudsley, *Biological Applications of Liquid Scintillation Counting*, Academic Press, N.Y. & London, 3 (1974).
246. C. T. Peng, en "The Current Status of Liquid Scintillation Counting" ed. E. D. Bransone(h), Grune & Stratton, New York, 283 (1970).
247. R. A. Caro, *Curso de Metodología de Radioisótopos y Radioquímica*, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., (1972).
248. *Curso de Metodología y Aplicación de Radioisótopos*, Comisión Nacional de Energía Atómica.
249. C. A. Russo, R. Boquet, A. Aragonés y G. A. Locascio, Reunión Conjunta Regional de P. A. A. B. S. - XIII Nacional de S. A. I. B., La Falda, Córdoba, Argentina, noviembre (1977).
250. M. Saffran y V. Shally, *Endocrinology*, 56, 523 (1955).
251. H. A. Krebs y K. Henseleit, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem*, 210, 33 (1932).
252. H. Wilson, *J. Clin. Endocrinol*, 13, 1465 (1953).
253. J. Seibl, *Espectrometría de masas*, ed. Alhambra (1973).
254. R. Gottlieb y R. B. Filho, en "Introducción a la espectrometría de masa de sustancias orgánicas", O. E. A., Washington D. C. (1976).
255. F. Mc Lafferty "Mass Spectrometry of Organics Ions", Academic Press, New York (1963).
256. A. H. Jackson, *Endeavour*, 1, 75 (1977).
257. P. B. Raman, D. C. Sharma, R. I. Dorfman y J. L. Gabrilove, *Biochemistry*, 4, 1376 (1965).
258. E. Kondo, T. Mitsugi y K. Tori, *J. Amer. Chem. Soc*, 87, 4655 (1965).
259. D. N. Kirk y M. S. Rajagopalan, *J. C. S. Chem. Comm*, 77 (1976).
260. J. Schmidlin y A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta*, 42, 2636 (1959).
261. R. H. Shapiro y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc*, 86, 2825 (1964).
262. R. Beugelmans, R. H. Shapiro, L. J. Durham, D. H. Williams, H. Budzikiewicz y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc*, 86, 2832 (1964).

263. R.H. Shapiro, D.H. Williams, H. Budzikiewicz y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 2837 (1964).
264. L. Tökés, G. Jones y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5465 (1968).
265. T. Sandor, J. Lamoreux y A. Lanthier, *Steroids*, 4, 213 (1964).
266. C.J. Brooks, R.V. Brooks, K. Fotherby, J.K. Grant, A. Klopper y W. Klyne, *J. Endocr.*, 47, 263 (1970).

INDICE

INTRODUCCION

1. Importancia de las hormonas adrenocorticales	1
2. La glándula suprarrenal	2
3. Corticoesteroides	3
3.1 " Glucocorticoides " y " Mineralocorticoides "	4
3.2 C-21 Esteroides 18 hidroxilados	10
4. Caminos de biosíntesis	11
4.1 Biosíntesis de Pregnenolona	11
4.2 Biosíntesis de Progesterona	13
4.3 Biosíntesis de Corticoesteroides	16
4.3.1 Vía Pregnenolona-Progesterona y vía de los compuestos 17 hidroxilados	16
4.3.2 Sistema 21 hidroxilasa	18
4.3.3 Sistema 11 hidroxilasa	19
4.3.4 Sistema " 18 hidroxilasa "	21
5. Los C-21 Esteroides 18 hidroxilados	22
5.1 Introducción	22
5.2 Antecedentes	24
5.3 Química ,	25
5.4 Bioquímica	27
5.5 Zonación	28
5.6 Fuente de enzimas y requerimiento de cofactores	28
5.7 Factores inhibidores	30
5.8 Oxidasas de función múltiple	30
5.9 Naturaleza de las enzimas de la oxidación del CH ₃ angular C-18 y precursores	31
5.10 Biología	32
Planteo del trabajo	35
Parte Experimental	37
1. Materiales	37
2. Métodos	39
A. Sistemas cromatográficos	39
a. Cromatografía descendente en papel	39

a.1 Sistema TPG	39
a.2 Sistema Bush B ₅	40
a.3 Sistema Bush B ₁	40
a.4 Sistema Bush A	40
a.5 Sistema " Cy-Di I "	40
a.6 Sistema " Cy-Bz "	41
B. Cromatografía en placa delgada	41
b.1 Sistema Heptano:acetato de etilo	41
C.Detección de los esteroides en los cromatogramas.	41
D.Elución de los compuestos	42
E. Medición de la radiactividad	43
e.1 Equipos utilizados	43
e.2 Preparación de las muestras	43
e.3 Elección de parámetros óptimos	43
e.3.1 Calibración de la ganancia	43
e.4 Corrección del "quenching" para un sólo radioisó- topo	44
e.4.1 Método de la relación de canales	44
e.4.2 Método del "standard" externo	47
e.5 Corrección del "quenching" para mezclas de dos radio- isótopos	48
e.5.1 Mediante el método de la relación de canales	48
e.5.2 Resolución de mezclas de dos radioisótopos utili- zando "standard" externo	51
F. Biosíntesis y aislamiento de 18 OH B	58
f.1 Purificación del precursor	58
f.2 Preparación del tejido	58
f.3 Incubación	58
f.4 Extracción	59
f.5 Separación e identificación de los compuestos	60
G. Purificación de las 2 formas de 18 OH B	60
H. Caracterización de los distintos esteroides por prepa- ración de derivados	61
h.1 Acetatos	61
h.2 Lactonas	61

I. Biosíntesis y aislamiento de 18 OH DOC	62
i.1 Purificación del precursor	62
i.2 Preparación del tejido	62
i.3 Incubación y extracción	62
i.4 Aislamiento de los compuestos	62
J. Espectrometría de masa	62
Fundamento	62
j.1 Preparación de las muestras de 18 OH B	64
Compuesto M	64
Compuesto R_M 4.33	65
Compuesto R_M 4.33	65
j.2 Preparación de las muestras de 18 OH progesterona	65
Compuesto I	66
Compuesto II	66
Compuesto III	66
Compuesto IV	66
j.3 Preparación de las muestras de 18 OH DOC	67
Compuesto X	67
Compuesto Y	67
Compuesto Z	67
K. Estudios de estructuras mediante doble marcación iso- tópica	68
k.1 Incorporación de $^{14}CH_3OH$	68
k.2 Estudio de la transformación inversa en H_2O	68
k.3 Incorporación de 3H_2O	69
k.4 Estudio de la transformación inversa en CH_3OH	69
RESULTADOS	70
I. Condiciones de trabajo y estabilidad de los compuestos	70
II. Caracterización de los distintos esteroides por forma- ción de derivados	71
II.a Formación de acetatos	71
II.b Formación de lactonas	72
II.b.1 Oxidación según Wilson	72
II.b.2 Oxidación crómica	72
III. Curso de reacción en medio acuoso	74

IV. Estudio de la transformación de M a R_M 4.33 en medios alcohólicos	74
V. Transformaciones en medios acidificados, acuosos y al- cohólicos	76
VI. Estudios de estructura por espectrometría de masa . . .	84
VI.a Estudios con 18 OH B	84
Espectro de masa del Compuesto M	84
Espectro de masa del Compuesto R_M 4.33	84
Espectro de masa del Compuesto R_M 4.33	86
VI.b Estudios con 18 OH Progesterona	90
Espectro de masa del Compuesto I	90
Espectro de masa del Compuesto II	93
Espectro de masa del Compuesto III	96
Espectro de masa del Compuesto IV	96
VI.c Estudios con 18 OH DOC	101
Espectro de masa del Compuesto X	101
Espectro de masa del Compuesto Y	103
Espectro de masa del Compuesto Z	103
VII. Estudios de estructura mediante doble marcación isotópica	105
a. Incorporación de $^{14}CH_3OH$ a 18 OH B ^3H-M	105
b. Estudio de la reversión de $^3H-^{14}C R_M$ 4.33 a M en H_2O radioinerte	106
c. Incorporación de 3H_2O en $^{14}C-R_M$ 4.33	107
d. Reversión de ($^3H + ^{14}C$)-M a R_M 4.33 en CH_3OH radio- inerte	108
VIII. Ensayo de la capacidad precursora de R_M^* 4.33 . . .	110
a. Preparación de los sustratos	111
b. Preparación del tejido	111
c. Ensayos	111
c1. Controles químicos	111
c2. Controles biológicos	112
c3. Incubados	112
DISCUSION	115
RESUMEN	122
BIBLIOGRAFIA	124