

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO CINÉTICO DEL ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE
DESHIDROGENASA / $\Delta^{5\rightarrow4}$ ISOMERASA DE TESTÍCULO Y OVARIO**

JOSÉ M. QUINTANA AGUIAR

Las Palmas de Gran Canaria, 1991



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GC
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA SALUD

ESTUDIO CINÉTICO DEL ENZIMA 3β -HIDROXIESTEROIDE
DESHIDROGENASA / Δ^{5-4} ISOMERASA DE TESTÍCULO Y
OVARIO

José M. Quintana Aguiar

1991

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
LAS PALMAS DE G. CANARIA	
N.º Documento	342.563
N.º Copia	342.571

D. CARLOS MANUEL RUIZ DE GALARRETA HERNÁNDEZ, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y

Dña. LUISA FERNANDA FANJUL RODRÍGUEZ, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

CERTIFICAN:

Que D. JOSÉ MARTÍN QUINTANA AGUIAR, alumno del Programa del Tercer Ciclo y Profesor Ayudante de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular de esta Universidad, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada "ESTUDIO CINÉTICO DEL ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA/ $\Delta^5\rightarrow 4$ ISOMERASA DE TESTÍCULO Y OVARIO", y que, hallándose concluída, autorizamos su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Las Palmas, Julio de 1991.

Fdo. Carlos M. Ruiz de Galarreta

Fdo. Luisa F. Fanjul Rodríguez



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis ha sido realizada bajo la dirección de los doctores Carlos M. Ruiz de Galarreta y Luisa F. Fanjul a los que deseo expresar mi más sincera gratitud. En especial, les estoy sumamente agradecido por abrirme las puertas hacia la consecución de un sueño y por el inagotable empeño en mejorar mi formación científica y la de nuestro entorno.

A Juan González, Profesor Asociado del Dpto. de Endocrinología Celular y Molecular por su amistad, estímulo y cooperación en la realización de este trabajo.

A don José Sarmiento, Técnico de Laboratorio recientemente incorporado al Dpto., que por su eficacia y dedicación al trabajo nos facilita a todos la realización de los experimentos.

Al alumno de Medicina Octavio López por el asesoramiento en temas informáticos.

A Mercedes Ramírez por su inestimable ayuda en la revisión del texto.

A los compañeros del Dpto. de Endocrinología Celular y Molecular, Francisco Estévez, Pino Santana, Lourdes Benítez, Isabel Marrero y Pilar Bracero que, por su amistad y colaboración desinteresada, han hecho más grato este trabajo.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Las Palmas de GC por las ayudas concedidas para la realización de cursos de especialización y perfeccionamiento.

A la Comunidad Autónoma de Canarias por la beca concedida para cubrir una estancia de diez meses en EEUU, así como a la Fundación Universitaria de Las Palmas por la ayuda complementaria para completar los doce meses.

A la CICYT por la ayuda PM 88/0213 y a la Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno Autónomo de Canarias por las ayudas 57/88, 20/88 y 21/88 que han financiado los gastos de este trabajo de Investigación.

Al NIH (National Pituitary Program) por la generosa donación de la FSH ovina y al Dr. Gordon Niswender por el anticuerpo de la progesterona

Muy particularmente a mis padres, por enseñarme en qué consiste el valor de la voluntad.

A Merci

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. PRÓLOGO Y OBJETIVOS CIENTÍFICOS	1
II. INTRODUCCIÓN	4
1. <i>LAS HORMONAS ESTEROIDES</i>	
2. <i>BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES</i>	
3. <i>VÍAS Δ^5 Y Δ^4 DE LA ESTEROIDOGENÉISIS</i>	
4. <i>3β-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA/$\Delta^{5\rightarrow4}$ ISOMERASA</i>	
III. MATERIAL Y MÉTODOS	11
1. <i>PRODUCTOS UTILIZADOS</i>	
1.1 Esteroides naturales y sintéticos	
1.2 Esteroides radiactivos	
1.3 Detergentes	
1.4 Material cromatográfico	
1.5 Productos y medios para los cultivos celulares	
1.6 Otros productos	
2. <i>ANIMALES UTILIZADOS</i>	
2.1 Animales adultos	
2.2 Hembras inmaduras	

3. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA

25

3.1 Obtención de órganos

3.2 Obtención de microsomas

3.3 Solubilización del enzima

3.4 Purificación parcial del enzima

4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA

4.1 Método operativo

4.2 Cálculo de la actividad enzimática

4.3 Extracción y separación de los productos de la reacción

4.4 Método rápido de la determinación de la actividad del enzima

5. CULTIVO DE CÉLULAS GRANULOSA

5.1 Tratamiento de los animales

5.2 Metodología

6. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1 Determinación de proteínas

6.2 Radioinmunoensayo de hormonas esteroides

7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

IV. RESULTADOS

1. *SEPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE LA REACCIÓN*
2. *SOLUBILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL ENZIMA DE MICROSOMAS*
3. *PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA*
4. *LINEALIDAD DE LA REACCIÓN RESPECTO AL TIEMPO CON LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA*
5. *LINEALIDAD DE LA REACCIÓN CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS UTILIZANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA*
6. *EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD^+ Y DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*
7. *ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DIVERSOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO USANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS*
8. *EFFECTO DE OTROS ESTEROIDES NATURALES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*

9. <i>COMPETICIÓN DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS POR EL CENTRO ACTIVO DEL ENZIMA DE OVARIO Y TESTÍCULO</i>	
10. <i>ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN EN PRESENCIA SIMULTÁNEA DE TODOS LOS SUSTRATOS DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO</i>	
11. <i>EFFECTO DE LA FSH Y BUT₂AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA EN CÉLULAS GRANULOSA MANTENIDAS EN CULTIVO PRIMARIO</i>	
12. <i>TABLAS Y FIGURAS</i>	
V. DISCUSIÓN	111
VI. CONCLUSIONES	119
VII. BIBLIOGRAFÍA	123
VIII. LABOR INVESTIGADORA REALIZADA POR EL CANDIDATO DURANTE SUS ESTUDIOS DE TERCER CICLO	135
1. <i>CRÉDITOS</i>	
2. <i>OTROS CURSOS REALIZADOS</i>	
3. <i>COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES</i>	
4. <i>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS</i>	
5. <i>PERSPECTIVAS DE FORMACIÓN POSDOCTORAL</i>	

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<i>Página</i>
TABLA I: Rf de los sustratos y productos de la reacción, que se representan en la Figura 1.	41
TABLA II: Solubilización del enzima 3 β -HSD de microsomas de testículo y ovario por distintas concentraciones de diferentes detergentes. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos.	43
TABLA III: Linealidad respecto al tiempo de la transformación de los distintos sustratos fisiológicos por el enzima 3 β -HSD de testículo. Los resultados se representan en la Figura 3.	46
TABLA IV: Linealidad respecto al tiempo de la transformación de los distintos sustratos fisiológicos por el enzima 3 β -HSD de ovario. En la Figura 4 se representan los resultados obtenidos.	48
TABLA V: Linealidad de la reacción catalizada por el enzima 3 β -HSD de testículo respecto a la concentración de proteínas. Los resultados se representan en la Figura 5.	50
TABLA VI: Linealidad de la reacción catalizada por el enzima 3 β -HSD de ovario respecto a la concentración de proteínas. La Figura 6 es una representación de los resultados obtenidos.	52
TABLA VII: Efecto de la concentración de NAD ⁺ sobre la actividad del enzima 3 β -HSD usando pregnenolona como sustrato. Los resultados se representan en la Figura 7.	54

TABLA VIII: Efecto de la concentración de NAD^+ sobre la actividad del enzima 3β -HSD usando 17α -hidroxipregnenolona como sustrato. Se representan en la Figura 8 los resultados obtenidos.	56
TABLA IX: Efecto de la concentración de NAD^+ sobre la actividad del enzima 3β -HSD de testículo usando dehidroepiandrosterona como sustrato. Los resultados se representan en la Figura 9.	58
TABLA X: Efecto de la concentración de NAD^+ sobre la actividad del enzima 3β -HSD de ovario usando androstendiol como sustrato. En la Figura 10 se representan los resultados.	60
TABLA XI: Efecto de la concentración de pregnenolona sobre la actividad del enzima 3β -HSD en testículo y ovario. Los resultados se representan en la Figura 11.	62
TABLA XII: Efecto de la concentración de 17α -hidroxipregnenolona sobre la actividad del enzima 3β -HSD en testículo y ovario. En la Figura 12 se representan los resultados.	64
TABLA XIII: Efecto de la concentración de dehidroepiandrosterona sobre la actividad del enzima 3β -HSD en testículo y ovario. Los resultados se representan en la Figura 13.	66
TABLA XIV: Efecto de la concentración de androstendiol sobre la actividad del enzima 3β -HSD en testículo y ovario. Los resultados se representan en la Figura 14.	68

TABLA XV:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD testicular de los distintos productos de la reacción usando pregnenolona como sustrato. La Figura 15 muestra los resultados obtenidos.	70
TABLA XVI:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD ovárica de los distintos productos de la reacción usando pregnenolona como sustrato. La Figura 16 muestra los resultados obtenidos.	72
TABLA XVII:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD testicular de los distintos productos de la reacción usando 17 α -hidroxipregnenolona como sustrato. La Figura 17 muestra los resultados obtenidos.	74
TABLA XVIII:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD ovárica de los distintos productos de la reacción usando 17 α -hidroxipregnenolona como sustrato. La Figura 18 muestra los resultados obtenidos.	76
TABLA XIX:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD testicular de los distintos productos de la reacción usando dehidroepiandrosterona como sustrato. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos.	78
TABLA XX:	Efecto sobre la actividad enzimática 3 β -HSD ovárica de los distintos productos de la reacción usando dehidroepiandrosterona como sustrato. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos.	80

TABLA XXI:	Efecto sobre la actividad enzimática 3β-HSD testicular de los distintos productos de la reacción usando androstendiol como sustrato. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos.	82
TABLA XXII:	Efecto sobre la actividad enzimática 3β-HSD ovárica de los distintos productos de la reacción usando androstendiol como sustrato. La Figura 22 muestra los resultados obtenidos.	84
TABLA XXIIIa:	Efecto de otros esteroides naturales sobre la actividad del enzima 3β-HSD de testículo usando los sustratos fisiológicos del enzima. En la Figura 23 se representan los resultados obtenidos.	86
TABLA XXIIIb:	Efecto de otros esteroides naturales sobre la actividad del enzima 3β-HSD de ovario usando los sustratos fisiológicos del enzima. Los resultados obtenidos se representan en la figura 23.	87
TABLA XXIV:	Desplazamiento de la pregnenolona del centro activo del enzima de testículo por los otros sustratos de la reacción. Los resultados se representan en la Figura 24.	89
TABLA XXV:	Desplazamiento de la pregnenolona del centro activo del enzima de ovario por los otros sustratos de la reacción. En la Figura 25 se muestran los correspondientes resultados.	91
TABLA XXVI:	Desplazamiento de la 17α-hidroxipregnenolona del centro activo del enzima de testículo por los otros sustratos de la reacción. Los resultados se muestran en la Figura 26.	93

TABLA XXVII:	Desplazamiento de la 17α -hidroxipregnenolona del centro activo del enzima de ovario por los otros sustratos de la reacción. Se muestran los resultados en la Figura 27.	95
TABLA XXVIII:	Desplazamiento de la dehidroepiandrosterona del centro activo del enzima de testículo por los otros sustratos de la reacción. Los resultados se representan en la Figura 28.	97
TABLA XXIX:	Desplazamiento de la dehidroepiandrosterona del centro activo del enzima de ovario por los otros sustratos de la reacción. Los resultados se presentan en la Figura 29.	99
TABLA XXX:	Desplazamiento del androstendiol del centro activo del enzima de testículo por los otros sustratos fisiológicos del enzima. Los resultados se representan en la Figura 30.	101
TABLA XXXI:	Desplazamiento del androstendiol del centro activo del enzima de ovario por los otros sustratos de la reacción. Los resultados se muestran en la Figura 31.	103
TABLA XXXIIa:	Efecto de concentraciones saturantes de los distintos sustratos individuales sobre la actividad del enzima de testículo y ovario. En la Figura 32 se representan los resultados.	105
TABLA XXXIIb:	Transformación de los sustratos del enzima de testículo y ovario en una mezcla que contiene los cuatro esteroides a concentraciones K_M . En la Figura 32 se presentan los resultados.	106

TABLA XXXIIc: Transformación de los sustratos del enzima de testículo y ovario en una mezcla que contiene los cuatro esteroides a concentraciones saturantes. Los resultados se muestran en la Figura 32.	107
TABLA XXXIII: Efecto del tratamiento con FSH y But ₂ AMPc sobre la actividad del enzima 3β-HSD en células granulosa mantenidas en cultivo primario. En la Figura 33 se muestran los resultados experimentales.	109
TABLA RESUMEN I: Purificación parcial del enzima de testículo y ovario.	28
TABLA RESUMEN II: Resumen de los parámetros cinéticos del enzima de testículo y ovario.	31
TABLA RESUMEN III: Resumen de ID ₅₀ de los distintos sustratos de la reacción sobre los otros sustratos fisiológicos del enzima de ovario y testículo.	34
TABLA RESUMEN IV: Resumen de K _i de los sustratos fisiológicos del enzima de testículo y ovario.	36
TABLA RESUMEN V: Eficacia catalítica del enzima de testículo y ovario para los cuatro sustratos fisiológicos.	37

ABREVIATURAS

- ACAT:** Acil-CoA: colesterol acil transferasa
- AMPC:** 3',5' Adenosin monofosfato cíclico
- Androstendiol:** 5-Androsten-3 β ,17 β -diol
- Androstendiona :** 4-Androsten-3,17-diona
- BCA:** Ácido bicinconfínico
- But₂AMPC:** N'-2'-O-dibutiriladenosín-3', 5'-monofosfato cíclico
- CCF:** Cromatografía en capa fina
- CE:** Colesterol esterasa
- CG:** Célula granulosa
- Chaps :** 3-[3-(Colamidopropil)dimetil-amonio]1-propanosulfonato
- Ci:** Curio
- Cianoketona:** 2 α -Ciano-4,4,17 α -trimetil-17 β -hidroxi-5-androsten-3-ona
- CMC:** Concentración micelar crítica
- CM-Sephadex:** Carboximetil-Shephadex
- DEAE-Sephacel:** Dietilaminoetil-Sephacel
- Dehidroepiandrosterona:** 5-Androsten-3 β -hidroxi-17-one
- DES:** Dietilestilbestrol
- Dihidrotestosterona:** 5 α -Androstan-17 β -hidroxi-3-ona
- α -Diol:** 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol
- β -Diol:** 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol
- DMSO :** Dimetil sulfóxido
- Dpm:** Desintegraciones por minuto
- EDTA-Na₂:** Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
- EGTA :** Ácido etiléniglicol bis (β -amino etil éter) N,N,N'-tetraacético
- Estradiol:** 1,3,5 (10)-Estratrien-3 β ,17 β -diol
- Estrona:** 1,3,5 (10)-Estratrien-3-ol-17-ona
- FSH:** Hormona folículo estimulante
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad
- HEPES:** N-2 Hidroxietilpiperazina N'2 etanosulfonato)

17 α -Hidroxipregnenolona: 4-Pregnen-3 β ,17 α -dihidroxi-3,20-diona

17 α -Hidroxiprogesterona: 4-Pregnen-17 α -hidroxi-3,20-diona

HMGCoAR: 3-Hidroxi-3 metil glutaril CoA reductasa

3 β -HSD : 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5\rightarrow4}$ isomerasa

ID₅₀: Concentración inhibitoria 50%

K_i: Constante de inhibición

K_M: Constante de Michaelis-Menten

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

Ov: Ovario

P: Producto de la reacción

P-450c_{Arom}: Aromatasa

P-450c_{SCC}: Enzima desramificante del colesterol

P-450c_{17 α} : 17 α -Hidroxilasa/C₁₇₋₂₀Liasa

P-450c_{11 β} : 11 β -Hidroxilasa

PMSF : Flúor-fenil-metil-sulfonato

Pregnenolona : 4-Pregnen-3 β -ol-20-ona

Progesterona : 4-Pregnen-3,20-diona

Prot: Proteína

RIA: Radioinmunoensayo

Testosterona: 4-Androsten-17 β -hidroxi-3-ona

T: Testículo

V_{max}: Velocidad máxima de transformación

I
PRÓLOGO Y OBJETIVOS CIENTÍFICOS

Las hormonas esteroideas pertenecen, en los organismos superiores, a cinco grupos de compuestos estructuralmente relacionados que se sintetizan en células especializadas a través de una vía metabólica común: la esteroidogénesis. A pesar de sus similitudes estructurales, estas moléculas ejercen funciones diversas en los organismos superiores, y participan activamente en la regulación del metabolismo y la reproducción.

En las células esteroidogénicas el colesterol, sintetizado "de novo" o captado de las lipoproteínas plasmáticas, sufre distintas transformaciones para dar lugar, con especificidad tisular estricta, a progestágenos, andrógenos, glucocorticoides, mineralcorticoides y estrógenos.

Las reacciones implicadas en esta vía están catalizadas por hidroxilasas/desmolases mitocondriales o microsomales que convierten al colesterol en 3 β -hidroxiesteroides o 3-cetoesteroides que constituyen las vías Δ^5 y Δ^4 de la esteroidogénesis. Todos estos enzimas pertenecen a una superfamilia de hemoproteínas de secuencia conservada en los dominios de unión al Hem y al sustrato.

Las vías Δ^5 y Δ^4 están conectadas por el enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa (EC 1.1.1.145 / EC 5.3.3.1) que convierte cada 3 β -hidroxiesteroide (Δ^5) en su correspondiente 3-cetoesteroide (Δ^4). Aunque en determinados microorganismos, las actividades deshidrogenasa e isomerasa se encuentran en cadenas polipeptídicas distintas, en las células eucariotas superiores ambas actividades se localizan en una única entidad.

El enzima es un punto clave en la regulación de la esteroidogénesis en testículo (células de Leydig), ovario (células granulosa, luteales y de la teca interna), placenta (células trofoblásticas) y adrenales (zona fasciculata, reticularis y glomerulosa) y su actividad aumenta en todas ellas al ser estimuladas por las correspondientes hormonas tróficas (LH, FSH o ACTH).

Recientemente se ha clonado este enzima de placenta humano, glándula adrenal de

bovino y ovario de rata. Su secuencia de aminoácidos, deducida a partir de los correspondientes cDNA, ha demostrado la existencia de una sola cadena de 372 aminoácidos y 42 Kd que aparentemente no guarda homología de secuencia con otros enzimas de la esteroidogénesis.

A pesar de su importante papel en la regulación de la esteroidogénesis, las características cinéticas del enzima, su especificidad de sustrato y su inhibición por el producto final no han sido exhaustivamente estudiadas, y la confusión de datos en la literatura es considerable.

En el presente trabajo hemos purificado (200-300 veces) los enzimas de testículo y ovario. Con estas preparaciones hemos estudiado las características cinéticas del enzima, el efecto de los productos de la reacción (Δ^4 -cetoesteroides) sobre su actividad y la preferencia por el centro activo de los distintos sustratos. Además, se estudió la actividad del enzima frente a los cuatro sustratos en células granulosa (CG) mantenidas en cultivo primario y estimuladas con FSH o But₂AMPc.

Se presentan evidencias experimentales que sugieren diferencias entre los enzimas de ambos tejidos y que sea la disponibilidad de sustrato y no la concentración de producto final la forma en que se regula la actividad del enzima en el estado estacionario.

II

INTRODUCCIÓN

1. *LAS HORMONAS ESTEROIDES*
2. *BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES*
3. *VÍAS Δ^5 Y Δ^4 DE LA ESTEROIDOGENÉISIS*
4. *3β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA/ $\Delta^{5\rightarrow4}$ ISOMERASA*

La supervivencia y propagación de las especies dependen de la capacidad para mantener las funciones vitales y reproductoras de los individuos que la forman (13). A medida que los organismos evolucionan, aumenta el número y complejidad de los mecanismos encargados de mantener y coordinar ambos procesos, que en última instancia dependen de la capacidad de las células para comunicarse e intercambiar información (82,98).

La comunicación intercelular permite controlar el crecimiento, diferenciación y proliferación celular, el agrupamiento de las células individuales en tejidos y órganos, la coordinación de las funciones de los mismos y, en último término, el mantenimiento de la homeóstasis (82,98,128).

De la gran diversidad de moléculas reguladoras (hormonas) que utilizan los seres vivos, las caracterizadas desde un punto de vista químico por su bajo PM (catecolaminas, neurotransmisores, hormonas tiroideas y esteroides), se han mantenido relativamente invariables en la escala animal (128).

En el caso concreto de las hormonas esteroides, su origen filogenético como moléculas de señalización parece ser anterior al de otras hormonas, y se especula con la posibilidad de que el aumento de la disponibilidad de colesterol en las células primitivas (fundamentalmente en las membranas) constituyera una señal rudimentaria de multiplicación y/o división celular (13,28,128).

Esta acumulación de colesterol pudo conseguirlo la célula ancestral a partir del acetato acumulado como resultado del catabolismo de otras biomoléculas (hidratos de carbono y aminoácidos) en condiciones óptimas de disponibilidad de nutrientes (128). En el curso del proceso evolutivo, se derivarían a partir del colesterol moléculas más especializadas que conocemos hoy con el nombre genérico de hormonas esteroides (28).

1. LAS HORMONAS ESTEROIDES

Por sus efectos biológicos se reconocen cinco grupos de hormonas esteroides (glucocorticoides, mineralcorticoides, estrógenos, andrógenos y progestágenos) que participan de forma activa en la regulación del metabolismo hidrocarbonado (52), el equilibrio hídrico (31,43,87), la diferenciación del sistema nervioso central y la aparición de los caracteres sexuales secundarios (65), la maduración del óvulo (62,72,130) y el espermatozoide (118,120) y el mantenimiento del embarazo y la lactancia (3,10,55,95). Además, en los organismos menos evolucionados, esteroides específicos participan en los procesos de apareamiento, transición de la fase juvenil a la adulta, definición del sexo o la agrupación de los individuos en colonias y colectividades (80).

2. BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Se conoce con el nombre de esteroidogénesis una ruta metabólica, filogenéticamente conservada, por la que la molécula de colesterol (C_{27}) es transformada en células especializadas de numerosas especies en compuestos estructuralmente relacionados que tienen como característica común su especificidad y alta actividad biológica (9,31,46,65, 88,89,120,129,134).

La biosíntesis y secreción de hormonas esteroides se realiza total o parcialmente en células endocrinas especializadas del ovario (teca, granulosa y luteal), testículo (Leydig), adrenales (glomerulosa, reticularis y fasciculata) y células trofoblásticas de la placenta. Además, los tejidos periféricos contribuyen de forma variable en la transformación de los productos de secreción de las células esteroidogénicas en derivados con mayor o menor actividad biológica (1,2,33,105,135,137,138).

El origen del colesterol en estas células puede ser endógeno o exógeno (23). El colesterol celular endógeno es sintetizado a partir del acetato (8,9,24), cuyo paso limitante es el enzima microsomal 3-hidroxi-3 metil glutaril CoA reductasa (HMGCoAR). El

colesterol exógeno, por el contrario, depende del acceso de las lipoproteínas séricas a la célula y del sistema de captación de lipoproteínas dependiente de receptor en las mismas (8,9,23,25).

La síntesis "de novo" (colesterol endógeno) es importante, sobre todo, en CG indiferenciadas debido a su localización avascular dentro del folículo ovárico (4,8,9). La etapa limitante del proceso lo cataliza la HMGCoAR que se inhibe a niveles altos de colesterol intracelular (8,9,24). Concentraciones altas de colesterol intracelular activan, por otro lado, la ACAT (acil-CoA: colesterol acil transferasa, EC 2.3.1.26) que esterifica colesterol para su almacenamiento en forma de vesículas lipídicas y niveles bajos de colesterol activan la CE (colesterol esterasa, EC 3.1.1.13) que hidroliza ésteres del colesterol y libera colesterol esteroideogénico, contribuyendo ambas a mantener el equilibrio intracelular entre colesterol libre y esterificado (26,110,133).

En las células esteroideogénicas vascularizadas (células tecales, luteales y de Leydig) el colesterol unido a lipoproteínas es captado por endocitosis mediante un mecanismo degradativo común a otras líneas celulares (60,63), almacenándose en vesículas lipídicas en forma de ésteres del colesterol (110,133). En estas células las actividades ACAT y CE también están reguladas por los niveles altos de colesterol intracelular (119). Al contrario que en humanos, la rata utiliza preferentemente colesterol de HDL para la esteroideogénesis, que no es captado por el mismo mecanismo degradativo que las LDL en otras especies (4,102,109,119). Los inhibidores de enzimas lisosomales (cloroquina, y leupeptina) o de la internalización (dansylcadaverina y bacitracina), inhiben la internalización del complejo LDL-receptor, y por tanto disminuyen el flujo de la vía esteroideogénica (63,102,119).

La esteroideogénesis propiamente dicha comienza con la desramificación del colesterol en la membrana interna mitocondrial, proceso catalizado por el complejo enzimático P450_{scc} y considerado etapa limitante de la esteroideogénesis (65,80,88,120,122,134).

En el transporte del colesterol a la mitocondria están implicados los microtúbulos y

microfilamentos, ya que el tratamiento con colchicina o citocalasina B es capaz de inhibir selectivamente la biosíntesis de esteroides a partir del colesterol, pero no a partir de pregnenolona (5,122,123,131).

La pregnenolona es el precursor inicial común en todas las células esteroidogénicas, y se metaboliza a 3 β -hidroxi-5-en-esteroides y 3-ceto-4-en-esteroides (80,88,89,120,134).

La biosíntesis de esteroides a partir del colesterol necesita, además, de otras hidroxilaciones realizadas por citocromos P-450 microsomales o mitocondriales (88,89,91). Estos P-450 pertenecen a una superfamilia de hemoproteínas que abarca los P450_{SCC} y P450_{11 β} mitocondriales y los P450_{17 α} , P450_{C21} y P450_{Arom} microsomales (120,124). Todas estas hidroxilasas tienen una secuencia de aminoácidos conservada (30%) en el dominio de unión al Hem, y una secuencia de consenso en el dominio de unión al sustrato, que es compartido con otras proteínas ligadoras de esteroides tal y como se ha demostrado a partir de la secuenciación de los correspondientes cDNA (88,89,91,100).

3. VÍAS Δ^5 Y Δ^4 DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

Un aspecto importante de la vía esteroidogénica lo constituye la conversión de los Δ^5 -3-en-esteroides (pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstendiol) en los correspondientes 3-ceto-esteroides (progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona, androstendiona y testosterona) que constituyen las vías Δ^5 y Δ^4 de la esteroidogénesis (3,65,88,89,91,120). Ambas vías están conectadas por el enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD) que, junto a la P-450_{SCC}, se expresa en todas las células esteroidogénicas (88,89,91,134).

La demostración inicial de la existencia de un enzima capaz de convertir 3 β -hidroxi-5-en-esteroides en 3-ceto-4-en-cetoesteroides (107,108), hizo sospechar la participación de dos enzimas en el proceso (12,80): una deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) y otra isomerasa (EC 5.3.3.1) encargada de la migración del doble enlace desde el anillo B (Δ^5) al A (Δ^4),

de forma análoga al enzima bacteriano (104,111,112,116,117).

Esta hipótesis se basaba, además, en la amplia distribución tisular del enzima en mamíferos (42,54,66-69). Aunque los primeros intentos de purificar el enzima no consiguieron separar la actividad deshidrogenasa de la actividad isomerasa (54,77,94), se pensó no obstante que la especificidad tisular de la vía esteroidogénica implicaría una sola actividad deshidrogenasa y distintas isoenzimas de isomerasa (47,48,115). Esta hipótesis se apoyaba en evidencias indirectas que demostraban niveles diferentes de 3-ceto-esteroides en algunas de las múltiples enfermedades congénitas asociadas a déficit enzimático de 3 β -HSD (17,32,44,97).

4. 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA/ Δ^5-4 ISOMERASA

El enzima de placenta humano, adrenal de bovino y ovario de rata, ha sido recientemente clonado, y su secuencia de aminoácidos deducida a partir de los correspondientes cDNA (83,93,136,138). Ello ha permitido demostrar que la actividad deshidrogenasa e isomerasa del enzima en células de mamíferos no son separables durante el proceso de purificación, clonaje y expresión del enzima (81,85,137). Los mismos experimentos han demostrado que el enzima está formado por una sola cadena polipeptídica de 372 aminoácidos (42 K), responsable de la deshidrogenación de 3 β -hidroxi-esteroides y su posterior isomerización a 3-ceto-4-en-esteroides (76,81). El conocimiento de su secuencia de aminoácidos no parece demostrar la existencia de dominios consenso de unión al sustrato, común a los otros enzimas de la esteroidogénesis, aunque estas exploraciones de base de datos no han sido realizadas (88,89,100).

En respuesta a las hormonas tróficas (FSH, LH y ACTH), las células esteroidogénicas responden aumentando la actividad del enzima (49-51,73,92,93,106,108,113,114) y aumentando su expresión (27,85,88,89,93,100,134) tal y como se ha demostrado en experimentos recientes usando sondas de cDNA y anticuerpos específicos para inmunoprecipitar el enzima.

Se ha demostrado así, que las cantidades relativas de P-450_{c₁₇α} y 3β-HSD en una célula esteroidogénica son importantes a la hora de determinar la preferencia del metabolismo de la pregnenolona y los productos de la vía esteroidogénica excretados por la célula (7). Pero, además del control de la expresión génica de ambas enzimas, la preferencia por el sustrato también condiciona la regulación global de la vía (80).

El objetivo general de la presente memoria ha sido el estudio de las propiedades cinéticas del enzima 3β-HSD, su especificidad de sustrato y los efectos de los distintos productos de la reacción sobre los parámetros cinéticos del enzima.

Además, como la respuesta esteroidogénica a las hormonas gonadotróficas "in vitro" medida en función de la producción de progesterona (ovario), testosterona (célula de Leydig) o corticosterona (célula adrenal) se correlaciona con la actividad del enzima (46,49-51,106,114,115,129), hemos medido el efecto del tratamiento con FSH y But₂AMPc sobre la actividad 3β-HSD en CG mantenidas en cultivo primario, usando los cuatro sustratos del enzima.

III

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *PRODUCTOS UTILIZADOS*
2. *ANIMALES UTILIZADOS*
3. *PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA*
4. *ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA*
5. *CULTIVO DE CÉLULAS GRANULOSA*
6. *OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS*
7. *MÉTODOS ESTADÍSTICOS*

1. PRODUCTOS UTILIZADOS

1.1 Esteroides naturales y sintéticos

La pregnenolona (Pre), progesterona (Pro), 17α -hidroxipregnenolona (17α Pre), 17α -hidroxiprogesteron (17α Pro), dehidroepiandrosterona (Dhea), androstendiona (Δ^4 -Adiona), androstendiol (Adiol), testosterona (Test), dihidrotestosterona (DHT), estrona (E_1), estradiol (E_2), α -diol (5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol), β -diol (5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol) y dietilestilbestrol (DES) se obtuvieron de Sigma Chemical Co (St Louis, Mo). Todos los esteroides se purificaron antes de usar por recristalización a partir de una solución saturada y caliente en etanol absoluto.

1.2 Esteroides radiactivos

Los productos [$7\text{-}^3\text{H(N)}$]pregnenolona (57.2 mCi/mmol), [$4\text{-}^{14}\text{C}$]-progesterona (57.2 mCi/mmol), [$4\text{-}^{14}\text{C}$] 17α -hidroxiprogesteron (53 mCi/mmol), [$1,2,^3\text{H(N)}$]androstendiol (43 Ci/mmol), [$4\text{-}^{14}\text{C}$]testosterona (51.4 mCi/mmol), se adquirieron a New England Nuclear. Se obtuvieron de Amersham [$1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$]dehidroepiandrosterona (78 Ci/mmol) y [$7\text{-}^3\text{H(N)}$] 17α -hidroxipregnenolona (22.0 Ci/mmol). Este último compuesto ya no se suministra comercialmente.

Antes de usar todos los esteroides radiactivos se purificaron por cromatografía en capa fina (CCF), con dos recorridos sucesivos en el sistema cloroformo-éter (5:1,v/v).

1.3 Detergentes

Los detergentes Lubrol PX, Triton X-100, Triton N-101, Nonidet P-40 y Chaps fueron adquiridos a Sigma. Los detergentes Thesit y Colato sódico se obtuvieron de Calbiochem y el Tween 80 de Difco.

1.4 Material cromatográfico

Las placas preparadas de silicagel (20 x 20 cm y 0.2 mm de grosor) sobre soporte de plástico se obtuvieron de Merck. Los siguientes geles se obtuvieron de Pharmacia: Sephadex G-25, Carboximetil-Sephadex (CM-Sephadex) y Dietilaminoetil-Sephacel

(DEAE-Sephacel).

1.5 Productos y medios para los cultivos celulares

La L-glutamina, tinción de azul de tripán y medio de cultivo (McCoy's 5a modificado, sin suero), se obtuvieron de Gibco. Los antibióticos estreptomicina y penicilina G fueron suministrados por Sigma. Las placas de cultivo (35x10 mm) y los tubos de cultivo (12x75 mm) estériles, se obtuvieron de Falcon (Becton y Dickison Labware). Los Filtros Millex GV (0.2 μ m), se adquirieron de Millipore.

1.6 Otros productos

El But₂AMPc, DMSO (Dimetil sulfóxido), HEPES, PMSF, EDTA-Na₂, EGTA, azida sódica y gelatina (75 Bloom de piel de ternera) fueron suministrados por Sigma. El Dextrano T-70 se adquirió de Pharmacia-LKB. El carbón activo se obtuvo de J.T. Baker. El anticuerpo de progesterona fue generosamente donado por el Dr Niswender (Colorado State University). El anticuerpo de estradiol se adquirió de Arnel Products. La FSH (NIH-S16) fue donada por la National Pituitary Agency (National Institute of Health, Bethesda).

El resto de los productos para las técnicas utilizadas en la presente memoria fueron de la mejor calidad analítica que ofrece el mercado.

2. ANIMALES UTILIZADOS Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS

2.1. Animales adultos

Para la obtención de órganos se utilizaron ratas adultas, macho y hembra, de la cepa Sprague-Dawley, criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y mantenidas en jaulas transparentes en condiciones de estabulación óptimas, a temperatura controlada (23 ± 2 °C) e iluminación (12 horas luz/12 horas oscuridad) constantes, con libre acceso al agua de bebida y a una dieta estándar de laboratorio (Biona, Las Palmas).

2.2. Hembras inmaduras

Para los cultivos de células, se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley paridas en el animalario de la Facultad de Medicina por hembras preñadas consanguíneas adquiridas a Lettica SA (Barcelona) y mantenidas en las mismas condiciones de estabulación que los animales adultos. A los 22 días de edad las hembras se destetaron y se inició el tratamiento hormonal que se describe más adelante.

3. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA

3.1. Obtención de órganos

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y las gónadas se extrajeron en el quirófano. Los ovarios se obtuvieron por aproximación retroperitoneal, y los testículos por incisión escrotal y decapsulación de la túnica albúgea. Los órganos extraídos se lavaron y guardaron en tampón (10 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol, 0.25 M sacarosa, pH 7.4) a 4 °C, hasta su homogeneización y obtención de la fracción microsomal.

3.2. Obtención de microsomas

Los testículos y ovarios se homogeneizaron a 1000 rpm durante 1 min a 4 °C en tampón fosfato 50 mM (1mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol, 0.25 M sacarosa, PMSF 1 mM, pH 7.4) en un homogeneizador politrón PT 3000 (Kinematica). Después de centrifugar (10.000 x g, 30 min), el sobrenadante se decantó y se centrifugó 60 min a 100.000 x g. El sobrenadante se desechó y el precipitado de microsomas se resuspendió en tampón (10 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol, 20% glicerol, pH 7.4) y se homogeneizó para asegurar una total dispersión. La concentración de proteínas de la suspensión microsomal se determinó por el método de Bradford (19) y ajustó a una concentración de 2 mg/ml con el mismo tampón fosfato.

3.3. Solubilización del enzima

Con el propósito de seleccionar el detergente y la proporción óptima para la extracción del enzima, se probaron ocho detergentes habituales en la extracción de proteínas de membrana: Chaps, Colato Na₂, Triton X-100, Triton N-101, Lubrol Px, Thesit, Tween 80 y Nonidet P-40.

Alícuotas de 0.3 ml de la suspensión microsomal se incubaron en presencia de cada uno de los detergentes a concentración final comprendida entre el 0.03% y el 1%. Como control de la eficacia de la extracción, a una alícuota se le añadió un volumen de tampón fosfato equivalente al volumen de detergente.

Después de permanecer en agitación lenta 30 min a 4 °C, las alícuotas se centrifugaron a 100.000 x g durante 60 min, los sobrenadantes se recogieron y la actividad 3β-HSD se determinó con pregnenolona 50 μM (~2x10⁵ dpm) como sustrato, tal y como se explica más adelante. Los resultados se expresaron en porcentaje de actividad 3β-HSD extraída:

$$\% \text{ Actividad } 3\beta\text{-HSD} = (S/T) \times 100$$

donde:

S = Actividad en el sobrenadante, en presencia o ausencia (control) de detergente.

T = Actividad de la dispersión microsomal ensayada después de añadir un volumen de tampón fosfato idéntico al de detergente y haber permanecido a 4 °C durante todo el proceso de extracción.

3.4. Purificación parcial del enzima

Después de homogenizar (4 ml/testículo, 0.5 ml/ovario) en tampón pH 7.4 (10 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 14 mM β-mercaptoetanol, 0.25 M sacarosa) y obtener la fracción microsomal, las proteínas microsomales se ajustaron a 2 mg/ml. A este extracto, sometido a agitación suave, se le añadió chaps (20% en agua) hasta alcanzar el 0.3%. Después de permanecer en agitación durante 30 min, se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min y se recogió el sobrenadante (extracto chaps).

A la fracción soluble se le añadió lentamente sulfato de protamina (2% en tampón), hasta alcanzar una concentración final del 0.1%. La muestra permaneció en agitación suave 30 min y se centrifugó posteriormente a 50.000 x g durante 60 min. La fracción soluble se decantó y utilizó en los pasos de purificación posteriores .

El sobrenadante obtenido de precipitar el extracto de chaps con sulfato de protamina se pasó por una columna de CM-Sephadex (1.5 x 10 cm) equilibrada con tampón 10 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol, 20% glicerol y 0.3% chaps (pH 7.4). Se recogió la fracción con actividad 3 β -HSD que no se retuvo por el intercambiador. Esta fracción se pasó a través de una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x 10 cm) equilibrada con el mismo tampón anterior.

Después de aplicar la muestra, la columna se lavó exhaustivamente con tampón hasta asegurar la elución de todas las proteínas no retenidas. Se aplicó un gradiente continuo (~ 100 ml) de cloruro de sodio (0-0.4 M) en tampón fosfato con un formador de gradiente GM-1 (Pharmacia). Se recogieron fracciones de 2 ml con un colector TDC 80 (Gilson) y se ensayó la actividad 3 β -HSD con el método de la precipitación con digitonina que se describe más adelante. Las fracciones con actividad (el máximo de actividad eluye aproximadamente con 0.15 M de ClNa) se mezclaron y el ClNa se eliminó haciendo pasar a la muestra por una columna de Sephadex G-25 (2.5 x 30 cm) equilibrada con el mismo tampón inicial. Las muestras de testículo y ovario se alicuotaron en fracciones de 1 ml (30.5 μ g prot/ml y 6.0 μ g prot/ml, respectivamente) y guardaron a -70 °C para su utilización en los ensayos posteriores.

El promedio de purificación del enzima en ovario y testículo osciló entre 200-300 veces, según el experimento. En cada una de las purificaciones se usaron los órganos de 10-15 machos ó 30-40 hembras.

4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HIDROXIESTEROIDE-DESHIDROGENASA (E.C. 1.1.1.145)/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ ISOMERASA (5.3.3.1)

La actividad 3 β -HSD se determinó por un método radioenzimático (92), a partir de los distintos sustratos tritiados (Pre, 17 α Pre, Dhea, Adiol) y cuantificación de los productos, en presencia de NAD⁺.

4.1. Método operativo

La actividad enzimática se determinó en un volumen final de 100 μ l de tampón 0.05 M fosfato potásico (pH 7.4) conteniendo 1 mM EDTA, 6% DMSO, 0.6 mM NAD⁺, ³H-sustrato ($\sim 2 \times 10^5$ dpm) y concentraciones variables de sustrato no radiactivo (dependiendo del tipo de experimento). La reacción se inició añadiendo 80 μ l de muestra a 20 μ l de la solución de sustrato/NAD⁺. Los tubos se incubaron a 37°C en un baño de agitación Dubnoff (100 ciclos/min) durante tiempos que asegurasen un porcentaje de transformación del sustrato inferior al 15%, tal y como se determinó en experimentos que se describen en la sección de Resultados.

La reacción se paró con 10 volúmenes de éter dietílico a 4°C. Para determinar la eficacia de la extracción se añadió a cada tubo ¹⁴C-producto ($\sim 10^3$ dpm), y 25 μ g de sustrato y 5 μ g de producto para visualizar los esteroides después de su separación en CCF.

4.2. Extracción y separación de los productos de la reacción.

La fase orgánica se transfirió a tubos de vidrio (12x75 mm) y secó bajo corriente de nitrógeno. El extracto orgánico se redisolvió en 50 μ l de cloroformo y se aplicó a placas de cromatografía en capa fina. Cuando el sustrato era pregnenolona o dehidroepiandrosterona la cromatografía se desarrolló dos veces en el sistema cloroformo:éter (5:1,v/v). Cuando se usaron 17 α -hidroxipregnenolona o androstendiol como sustrato, los productos se separaron con tres recorridos sucesivos en el mismo sistema. Los sustratos se visualizaron con vapor de yodo y los productos con luz ultravioleta en una lámpara UVGL-58.

Las manchas correspondientes a los productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona

o Test), se recortaron ($\sim 1 \text{ cm}^2$) y la radiactividad asociada se determinó con 3 ml de líquido de centelleo (Optiscint "Hisafe" de LKB Wallac) en un contador Wallac 1410 de Pharmacia.

4.3 Cálculo de la actividad del enzima.

La actividad (A) del enzima se expresó como:

$$A = \text{nmoles producto/min/mg prot}$$

donde,

$$A = (n_s \times f_T) / t / \text{mg proteínas en } 80 \mu\text{l}$$

siendo

$$n_s = \text{nmoles de sustrato no radiactivo/tubo}$$

$$f_T = [(^{14}\text{C}_A / ^{14}\text{C}_R) \times (^3\text{H}_R / ^3\text{H}_A)] \quad \text{tal que } 0 \leq f_T \leq 1$$

El valor 0 corresponde a nula transformación de sustrato.

El valor 1 corresponde a la transformación total de sustrato.

Donde,

$^{14}\text{C}_A / ^{14}\text{C}_R$: representa la pérdida de producto durante el proceso de extracción.

siendo,

$^{14}\text{C}_A$: dpm de ^{14}C -producto añadidas a cada tubo al finalizar la reacción.

$^{14}\text{C}_R$: dpm de ^{14}C -producto recuperadas.

$^3\text{H}_A$: dpm de ^3H -sustrato añadidas a cada tubo.

$^3\text{H}_R$: dpm de ^3H -producto obtenidas.

t: tiempo de reacción en minutos, ajustado de modo que ($f_T \leq 0.15$).

4.4 Método rápido de la determinación de la actividad del enzima

En los experimentos de purificación se analizaron las distintas fracciones por un método radioenzimático inicialmente desarrollado por Philpott y Peron (14,99).

Alícuotas de cada fracción ($100 \mu\text{l}$) se diluyeron con tampón fosfato ($800 \mu\text{l}$) y se completó la mezcla de reacción con NAD^+ y ^3H -pregnenolona ($1 \mu\text{M}$, $\sim 2 \times 10^6$ dpm) hasta

1 ml. Inmediatamente ($t=0$), se retiraba una alícuota ($100\ \mu\text{l}$) de la mezcla de la reacción que se añadía a un tubo $900\ \mu\text{l}$ de una solución de digitonina al 1% (50% en EtOH). A los 30 minutos de incubación, otra alícuota ($100\ \mu\text{l}$) se procesaba de la misma manera. La digitonina forma un complejo insoluble con los 3β -hidroxiesteroides pero no con los 3-cetoesteroides que quedaban en solución después de centrifugar ($2.000 \times g$, 3 min, $4\ ^\circ\text{C}$) los dos tubos correspondientes a cada fracción. Alícuotas ($100\ \mu\text{l}$ del sobrenadante) de cada tubo se contaron con 4 ml de líquido de centelleo. Las fracciones con actividad 3β -HSD se identificaron por:

$$(^3\text{H dpm}_{30}) - (^3\text{H dpm}_0) > 0$$

Siendo:

$^3\text{H dpm}_{30}$: dpm en $100\ \mu\text{l}$ de sobrenadante de digitonina a los 30 min de incubación.

$^3\text{H dpm}_0$: dpm en $100\ \mu\text{l}$ de sobrenadante al tiempo cero de incubación.

5. CULTIVO DE CÉLULAS GRANULOSA

Entre los 23-25 días de edad las hembras inmaduras recién destetadas se inyectaron durante 5 días con DES ($1\ \text{mg}/60\ \mu\text{l}$ de solución oleosa/rata/día, vía s.c.). Este tratamiento estimula la aparición de folículos preantrales en el mismo estadio de desarrollo (65) y la proliferación de una población homogénea de células granulosa, tal y como se detallará en la sección de Resultados de la presente memoria.

Tras el tratamiento con DES, los animales (10 a 30 ratas por experimento) se sacrificaron por dislocación cervical en el cuarto de cirugía y los ovarios se extrajeron en condiciones de máxima esterilidad por aproximación retroperitoneal. Durante el sacrificio y extracción de los ovarios no se emplearon más de 2-3 minutos/rata.

Los ovarios se lavaron en el cuarto de cultivo, bajo una campana de flujo laminar, con 4-5 pases sucesivos por placas de cultivo estériles conteniendo medio McCoy's 5a

modificado. Las células granulosa se obtuvieron por punción cuidadosa de los folículos con agujas de insulina estériles (27x 1/2"). De esta forma, las células contenidas en los folículos fluyeron por expresión al medio de cultivo y el resto del tejido ovárico se desechó. Las células terminaron de disociarse por aspiración repetida del medio con pipetas plásticas estériles, de calibre decreciente.

Después de lavar las células por centrifugación en una centrífuga Beckman GPR de baja velocidad (4 °C, 1.500g x 5 min) se resuspendieron en 20 ml de medio fresco. Esta operación se repitió cuatro veces, y el agregado de células de la última centrifugación se resuspendió en un volumen pequeño (2.5-5 ml) de medio para evaluar el número y la viabilidad celular por el método del azul de tripan. El número de células totales y el número de células viables (que excluyen el colorante) por ml, se determinó usando una cámara de conteo de Neubauer. La viabilidad celular en todos los experimentos fue mayor o igual al 60% y el número de células viables obtenidas por cada ovario osciló (10^6 - 2×10^6) según los experimentos.

Las células granulosa se cultivaron en placas estériles Falcon (35x10 mm), a una densidad de $\sim 8 \times 10^5$ células viables/placa en 1 ml de medio McCoy's 5a modificado y se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37°C y una pCO₂ del 5% constante durante el experimento.

Para medir la producción de estradiol, los medios se suplementaron con Δ^4 -androstendiona (10^{-5} M) como sustrato de las aromatasas (6,61).

6. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente (UV-160, Shimadzu) a 595 nm por el método de Bradford (19), siguiendo las instrucciones de Bio-Rad. Se utilizó albúmina bovina como estándar, en un rango de 2.5-20 μ g.

Las determinaciones de proteínas en muestras más diluidas se realizó con el método del BCA, utilizando el kit suministrado por Pierce cuyo rango de trabajo óptimo es de 0.5-20 μg .

6.2 Radioinmunoensayo de hormonas esteroideas

Los niveles de progesterona y estradiol se evaluaron en los medios de cultivo de los distintos grupos experimentales, almacenados a -20°C . Para separar la hormona libre de la ligada se usó una solución de carbón activo/dextrano (10:1) en tampón fosfato de trabajo frío (45).

Los anticuerpos se diluyeron hasta alcanzar una titulación de 1:20.000 para el anticuerpo de progesterona y 1:50.000 para el de estradiol. La unión específica fue del 30% y 36% para los anticuerpos de estradiol y progesterona respectivamente. El anticuerpo de progesterona tiene reacción cruzada con andrógenos (15%) y menos del 0.01% con otros esteroides. El anticuerpo de estradiol reconoce también a estrona (14%), estriol (5%) y menos del 0.001% a otros esteroides, incluidos los glucocorticoides (45).

7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se aplicaron métodos de regresión lineal para la determinación de las concentraciones de proteínas y linealidad de la transformación del sustrato respecto al tiempo y cantidad de enzima.

Las concentraciones de hormonas (progesterona y estradiol) en los medios de los cultivos celulares se calcularon utilizando un programa de 4 parámetros (log-logit) desarrollado por Rodbard y col. (71,103). Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del 5 y 10% respectivamente.

Los parámetros cinéticos aparentes, K_M y $V_{\max}$ con los distintos sustratos se calcularon ajustando los valores experimentales con el programa Enzpack 3 (Biosoft). Las

determinaciones experimentales de cada parámetro se realizaron dos o tres veces (según los casos) y cada punto experimental se determinó por triplicado. En las correspondientes tablas se dan los valores de las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo.

Las K_m y V_{max} se determinaron por los métodos Directo, Wilkinson, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf y Lineweaver-Burk (37). Los coeficientes de correlación en todos los casos estuvieron entre 0.87 y 0.99 y los valores obtenidos para los parámetros cinéticos por los distintos métodos fueron concordantes y se desviaban entre sí menos del 5%. A efectos ilustrativos en las correspondientes figuras se muestran sólo las curvas de saturación y doble recíproca.

En los experimentos de competición entre los distintos sustratos se calculó la ID_{50} ajustando los datos experimentales a la ecuación de 4 parámetros (78):

$$R = [a / (1 + bD^c)] + d$$

donde:

- a: Es función de la diferencia entre los valores máximo y mínimo de R.
- b: Es función de la ID_{50} .
- c: Depende de la tangente a la curva.
- d: Actividad residual inespecífica.
- R: Respuesta (% actividad).
- D: Dosis de inhibidor utilizada.

Las ID_{50} se calcularon para $R=50$ en la ecuación anterior.

Cuando con la anterior ecuación se ajustaron los datos experimentales correspondientes a la inhibición por productos, la dependencia de los parámetros a,b,c y d fue aproximadamente la unidad, lo cual se corresponde con el aparente paralelismo respecto al eje x que se observa en las distintas representaciones gráficas (21,78).

Para el cálculo de las constantes de inhibición hemos asumido que midiendo la transformación de sustrato por el método radioenzimático, éstos compiten entre sí según un modelo de inhibición competitiva. Si consideramos que el enzima sigue una cinética del tipo:

$$(1) \quad V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

tal y como se ha demostrado por el tratamiento de los datos experimentales, donde:

V_o : Velocidad de transformación del sustrato en producto

$[S]$: Concentración de sustrato

$V_{\max}$: Velocidad máxima de transformación del sustrato en producto

K_M : Constante de Michaelis-Menten

Considerando los otros sustratos como competidores (I) tendremos que:

$$(2) \quad V_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M (1 + [I] / K_i) + [S]}$$

Siendo:

V_i : velocidad de la reacción en presencia de inhibidor

K_i : Constante de inhibición

Combinando (1) y (2) resulta,

$$(3) \quad \frac{V_o}{V_i} = \frac{K_M(1 + ([I]/K_i)) + [S]}{K_M + [S]}$$

Cuando $[S]=K_M$, esta ecuación da:

$$(4) \quad K_i = \frac{[I]}{2((V_o/V_i) - 1)}$$

y para $[S]$ distinta a K_M tendremos,

$$(5) \quad K_i = \frac{[I]}{((([S]/K_M)((V_o/V_i) - 1) + (V_o/V_i)) - 1)}$$

Cuando $V_o=2V_i$ (es decir cuando alcanzamos la ID_{50}), habrá varias soluciones en la ecuación anterior:

Para $[S]=K_M$, $K_i=ID_{50}/2$

Cuando $[S] \gg K_M$, $K_i < ID_{50}$

Para $[S] \ll K_M$, $K_i=ID_{50}$

La aplicación de las ecuaciones (4) y (5) nos ha permitido determinar las K_i de los distintos sustratos del enzima de testículo y ovario.

Las diferencias entre los valores de K_M^S y K_M^{NAD} para los distintos sustratos se calculó para cada enzima aplicando el análisis de la varianza. Las diferencias para un mismo sustrato en dos tejidos distintos fueron comparadas aplicando el test "t" de Student. En todos los casos el nivel de significatividad se fijó en $p < 0.05$, aunque con frecuencia se superaron niveles más restrictivos.

IV

RESULTADOS

- 1. SEPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE LA REACCIÓN*
- 2. SOLUBILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL ENZIMA DE MICROSOMAS*
- 3. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA*
- 4. LINEALIDAD DE LA REACCIÓN RESPECTO AL TIEMPO CON LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA*
- 5. LINEALIDAD DE LA REACCIÓN CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA UTILIZANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA*
- 6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD⁺ Y DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*
- 7. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO USANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN*
- 8. EFECTO DE OTROS ESTEROIDES NATURALES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*
- 9. COMPETICIÓN DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS POR EL CENTRO ACTIVO DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*
- 10. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN EN PRESENCIA SIMULTÁNEA DE TODOS LOS SUSTRATOS DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO*
- 11. EFECTO DE LA FSH Y BUT₂AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA EN CÉLULAS GRANULOSA MANTENIDAS EN CULTIVO PRIMARIO*
- 12. TABLAS Y FIGURAS*

1. SEPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE LA REACCIÓN

Los sustratos y productos de la reacción se lograron separar usando un único sistema de solventes (cloroformo:éter, 5:1, v/v) idéntico al descrito (49-51,106). En el caso de la separación de 17α -hidroxipregnenolona de 17α -hidroxiprogesterona y de androstendiol y testosterona el método proporcionó una buena resolución a condición de someter el extracto etéreo a tres recorridos sucesivos, tal y como se presenta en la Figura 1, que muestra los R_f correspondientes a cada sustrato o producto de la reacción de la Tabla I.

2. SOLUBILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DEL ENZIMA DE MICROSOMAS

El enzima 3β -HSD se encuentra asociado a membranas (7,36,53). Para extraer el enzima de los microsomas de ovario y testículo, se evaluó el efecto de la concentración micelar crítica (CMC) de distintos detergentes sobre la actividad del enzima y el porcentaje de enzima extraído (Figura 2). Usando el detergente zwitteriónico Chaps a concentración del 0.3%, se consiguió solubilizar el 89 % y 92% del enzima de los microsomas de ovario y testículo respectivamente. Aunque el uso de Thesit a concentraciones bajas (0.03%) permitió solubilizar hasta un 64% y 74% del enzima, en ovario y testículo respectivamente, a concentraciones superiores el rendimiento disminuía probablemente debido a la desnaturalización del enzima. Resultados análogos se obtuvieron con el Lubrol PX. El Colato- Na_2 y Tween-80 fueron los menos efectivos para solubilizar el enzima en todo el rango de concentraciones utilizadas.

Los extractos microsomales del enzima se mantuvieron durante todo el proceso con glicerol al 20% y se utilizaron para la purificación parcial del enzima de ovario y testículo usados en los experimentos de caracterización.

3. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA

En la Tabla Resumen I, se muestra un ejemplo representativo de un experimento de purificación parcial del enzima de testículo. Resultados similares se obtuvieron con el enzima de ovario. Las proteínas extraídas con chaps al 0.3% fueron sometidas a una precipitación con sulfato de protamina (5) al 0.1%. Las columnas de CM-Sephadex (1.5 x 10 cm) y DEAE-Sephacel (1.5 x 10 cm), se equilibraron con tampón fosfato 10 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, 14 β -mercaptoetanol, 20% glicerol (pH 7.4) suplementado con un 0.3 % de chaps. El enzima no se retuvo en la columna de intercambio catiónico y mediante un gradiente continuo 0-0.4 M ClNa en el mismo tampón se eluyó (~ 0.15 M ClNa) de la columna de DEAE-Sephacel. La actividad 3 β -HSD en las distintas fracciones se ensayó mediante el método radioenzimático de precipitación con digitonina (14,16,99). Las fracciones activas se analizaron posteriormente por el método convencional, usando ^3H -pregnenolona como sustrato. El enzima se purificó entre 200 y 300 veces según los experimentos. El extracto purificado del enzima era estable durante periodos de más de 2 meses en presencia de glicerol al 20%, pero perdía rápidamente la actividad, incluso a -70°C , en ausencia del mismo.

4. LINEALIDAD DE LA REACCIÓN RESPECTO AL TIEMPO CON LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA

Se estudió la linealidad respecto al tiempo (1-10 min) de los enzimas de ovario y testículo usando concentraciones de NAD^+ (0.6mM) deducidas de experimentos preliminares de este laboratorio (49,50,106). En las Figuras 3 y 4 se representan los datos de las Tablas III y IV, ajustadas por el método de los mínimos cuadrados. Los coeficientes de correlación fueron mayores que 0.98 para todas las rectas obtenidas. Independientemente del sustrato, la actividad específica del enzima de ovario es mayor que la de testículo, aunque el orden de velocidades de transformación de los cuatro sustratos es el mismo para ambos tejidos ($\text{Pre} \approx \text{Adiol} > \text{Dhea} > 17\alpha\text{Pre}$).

Tabla Resumen I

PURIFICACIÓN PARCIAL DEL ENZIMA 3 β -HSD

Fracción	Activ. específica (nmol Pro/min/mg prot)	Factor purificación (veces)
Homogeneizado	0.5	1.0
Extracto chaps	6.2	12.4
Protamina	46.7	93.4
CM-Sephadex	70.1	140.2
DEAE-Sephacel	134.5	269.0

Los órganos se homogeneizaron y mediante centrifugación diferencial se obtuvo la fracción microsomal. La actividad 3 β -HSD se solubilizó con chaps (0.3%) y se precipitó con sulfato de protamina. El sobrenadante se pasó por CM-Sephadex y la fracción no retenida por DEAE-Sephacel. Para la elución de la actividad 3 β -HSD se utilizó un gradiente lineal (0-0.4 M ClNa) en tampón fosfato pH 7.4. La actividad enzimática se determinó con ^3H -pregnenolona (50 μM) como sustrato, tal y como se describe en Material y Métodos.

En los experimentos subsiguientes se eligieron tiempos de incubación ≤ 10 minutos, para todos los sustrato utilizados, aunque con 17α -hidroxipregnenolona como sustrato del enzima de ovario se fijaron en algunos experimentos tiempos de hasta 20 min. Estos tiempos aseguran que la transformación de sustrato radiactivo sea en todos los casos inferior al 15% (79).

5. LINEALIDAD DE LA REACCIÓN CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS UTILIZANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS DEL ENZIMA

Para fijar las condiciones óptimas de ensayo se estudió también la linealidad de la reacción a distintas concentraciones de proteínas (Figuras 5 y 6), utilizando los tiempos de incubación óptimos para cada sustrato determinados en los experimentos anteriores. Las rectas se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0.98. La actividad del enzima testicular fue lineal usando hasta $2.44 \mu\text{g}$ de proteínas por ensayo, independientemente del sustrato utilizado ($4 \mu\text{M}$) en presencia de NAD^+ (0.6 mM). Los sucesivos experimentos se realizaron con $1.22 \mu\text{g}$ de proteínas de testículo excepto algunos experimentos con 17α -hidroxipregnenolona que se utilizaron $2.44 \mu\text{g}$. La actividad del enzima de ovario fue lineal utilizando hasta $0.48 \mu\text{g}$ de proteínas por ensayo con los cuatro sustratos fisiológicos ($4 \mu\text{M}$), en presencia de NAD^+ (0.6 mM). Los experimentos posteriores se llevaron a cabo con $0.24 \mu\text{g}$ de proteínas de ovario por medida.

6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD^+ Y DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO

En los experimentos subsiguientes se tomaron tiempos de incubación y concentraciones de proteínas que permitieron obtener resultados dentro de condiciones de ensayo estrictamente lineales, con especial precaución que, como máximo, el 15% del sustrato radiactivo fuera transformado en producto (79).

La dependencia de los parámetros cinéticos aparentes del enzima respecto a la concentración de NAD^+ se estudió para cada sustrato en ovario y testículo (Figuras 7-10). Por razones de claridad, sin embargo, las figuras correspondientes muestran solamente las representaciones directa de Michaelis-Menten y doble recíproca de Lineaweaver-Burk. Los valores de las Tablas VII-X se ajustaron por medio del programa Enzpack 3 para obtener los valores de K_M^{NAD} (37) y se tabularon en la **Tabla Resumen II**. Estos resultados, obtenidos a distintas concentraciones de NAD^+ , demostraron que la concentración inicial de NAD^+ utilizada (0.6 mM) para la caracterización del enzima era saturante independientemente del sustrato ensayado y se siguió utilizando en experimentos posteriores. Para cada sustrato se determinaron los valores de K_M^{NAD} en ovario y testículo.

La comparación de los valores de K_M^{NAD} de testículo y ovario demuestran las secuencias $17\alpha\text{Pre} > \text{Pre} \approx \text{Adiol} > \text{Dhea}$ y $17\alpha\text{Pre} > \text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Dhea}$, respectivamente. Las diferencias entre las K_M^{NAD} en testículo y ovario para los distintos sustratos se determinaron aplicando el análisis de la varianza.

Las comparaciones entre K_M^{NAD} para un mismo sustrato entre el enzima extraído de los dos órganos se realizó por comparación de las medias aplicando el test "t" de Student. Puede observarse que existen diferencias significativas de K_M^{NAD} entre los enzimas de testículo y ovario cuando el sustrato utilizado es Pre o Dhea ($p < 0.05$).

El estudio de las velocidades de reacción en presencia de concentraciones crecientes de cada sustrato se representa en las Figuras 11-14 y los valores obtenidos se muestran en la **Tabla Resumen II**. En todos los experimentos se usó la concentración saturante de NAD^+ establecida previamente (0.6 mM). Los resultados se obtuvieron a partir del tratamiento de los datos de las correspondientes Tablas de resultados (XI-XIV) con el programa Enzpack 3, tal y como se detalló para el uso del cálculo de NAD^+ .

Las comparaciones entre K_M^s para un mismo enzima o entre K_M^s del mismo sustrato para dos enzimas diferentes se realizó de forma idéntica a la ya descrita para el caso de K_M^{NAD} . En testículo puede observarse la secuencia $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Pre} \approx \text{Dhea}$ similar a

Tabla Resumen II

PARÁMETROS CINÉTICOS DEL ENZIMA 3 β -HSD

Sustrato	Testículo		Ovario	
	K_M^S (μ M)	K_M^{NAD} (μ M)	K_M^S (μ M)	K_M^{NAD} (μ M)
Pre	0.20 $\pm$ 0.01	79.5 $\pm$ 1.8 [†]	0.26 $\pm$ 0.01 [§]	163.0 $\pm$ 8.1 ^{§†}
17 α Pre	3.52 $\pm$ 0.03 ^{§†}	251.8 $\pm$ 16.7 [§]	2.21 $\pm$ 0.09 ^{§†}	207.6 $\pm$ 13.5 [§]
Dhea	0.26 $\pm$ 0.02 [†]	29.0 $\pm$ 1.3 ^{§†}	0.13 $\pm$ 0.01 ^{§†}	58.2 $\pm$ 1.3 ^{§†}
Adiol	0.65 $\pm$ 0.02 ^{§†}	86.0 $\pm$ 6.5	1.07 $\pm$ 0.04 ^{§†}	94.8 $\pm$ 5.0 [§]

Se resumen los parámetros cinéticos (K_M^S y K_M^{NAD}) del enzima 3 β -HSD de testículo y ovario correspondientes a las tablas VII a IX. Los valores (medias $\pm$ SEM) se calcularon con el programa Enzpack 3 (Biosoft) tal y como se detalla en Material y Métodos, y las representaciones gráficas (Figuras 7-14) se realizaron con el programa gráfico Sigma Plot V-4.0. Para las determinaciones de K_M^S se utilizaron concentraciones saturantes de NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones variables de sustrato. En las determinaciones de K_M^{NAD} se usaron en todos los casos concentraciones saturantes de sustrato y se variaron las concentraciones de NAD⁺.

§ $p < 0.05$ respecto a los valores de los otros parámetros en la misma columna.

† $p < 0.05$ respecto al correspondiente valor en el otro tejido.

la de ovario: $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Pre} > \text{Dhea}$. Las comparaciones de las K_M^s de testículo y ovario revelan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando los sustratos utilizados son $17\alpha\text{Pre}$, Dhea y Adiol.

7. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA USANDO LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN

Para evaluar la posible inhibición del enzima por el producto final, se midió la actividad del enzima de ambos tejidos a concentraciones $1 \mu\text{M}$ de cada sustrato y concentraciones crecientes (logarítmicas) de productos de la reacción (0.1 - $10 \mu\text{M}$). Las concentraciones de sustrato y producto de la reacción utilizadas se seleccionaron en base a los escasos datos publicados sobre las concentraciones de hormonas esteroides en el fluido folicular (29,34,35,64,84) o líquido del intersticio testicular (22,101,135). Las ID_{50} se determinaron a partir de los valores experimentales (Tablas XV-XVIII), usando una curva de 4 parámetros para las estimadas (21,78). Los mismos datos, ajustados con el programa Sigma-Plot, se representan en las Figuras 15-22. Puede observarse que los productos de la reacción ejercen efectos inhibitorios mínimos sobre la actividad del enzima. Además, la aplicación de la ecuación de cuatro parámetros descrita en la sección III-7 de esta memoria, demostró una dependencia de los parámetros a, b, c y $d \approx 1$ que concuerdan con el paralelismo observado de los ajustes respecto al eje de ordenadas. No obstante usando pregnenolona como sustrato el enzima de ovario es sensible a la inhibición de todos los productos de la reacción a concentraciones $10 \mu\text{M}$, con un orden de potencia $\text{Pro} \approx \text{Test} > 17\alpha\text{Pro} > \Delta^4\text{-Adiona}$. De la misma forma, usando 17α -hidroxipregnenolona ($3 \mu\text{M}$) como sustrato el enzima testicular es inhibido por los distintos productos ($30 \mu\text{M}$) con la secuencia $\text{Pro} > \Delta^4\text{-Adiona} > \text{Test} > > 17\alpha\text{Pro}$ y el de ovario únicamente por Pro y $\Delta^4\text{-Adiona}$. No se observan efectos inhibitorios por el producto de la reacción cuando el sustrato utilizado fue dehidroepiandrosterona o androstendiol.

8. EFECTO DE OTROS ESTEROIDES NATURALES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO

Se evaluó además, el efecto de otros esteroides naturales (DHT, α -Diol, β -Diol, E_1 y E_2) sobre la actividad del enzima de testículo y ovario, usando como sustratos ^3H -Preg, ^3H - 17α Pre y ^3H -Dhea. Los sustratos y posibles inhibidores del enzima se usaron en cantidades equimolares ($1\ \mu\text{M}$). A efectos comparativos estudiamos también el efecto de $1\ \mu\text{M}$ de cianoketona (2α -ciano-4,4,17 α -trimetil-17 β -hidroxi-5-androsten-3-ona) un potente inhibidor del enzima (121,127,132). La DHT y α -Diol no ejercen efectos aparentes sobre el enzima de ovario y testículo independientemente del sustrato utilizado. Los esteroides β -Diol, E_1 y E_2 ejercen efectos inhibitorios sobre el enzima con cualquiera de los sustratos utilizados, siguiendo un orden de potencia $E_1 \approx E_2 > \beta$ -Diol para testículo y $E_1 > E_2 \approx \beta$ -Diol para ovario. Las diferencias estadísticas entre los resultados se compararon utilizando el test "t" de Student. El nivel de significación se estableció a $p < 0.05$.

9. COMPETICIÓN DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS POR EL CENTRO ACTIVO DEL ENZIMA EN OVARIO Y TESTÍCULO.

Puesto que el enzima 3β -HSD transforma en condiciones fisiológicas Pre, 17α Pre, Dhea y Adiol, en sus correspondientes 3-cetoesteroides (65,80,89,120), y en las células tecales y de Leydig operan simultáneamente las vías Δ^5 y Δ^4 (106,129), se estudió para cada sustrato y tejido el efecto de los otros sustratos utilizados como competidores. Los resultados obtenidos se representan en las Figuras 23-30. Los valores de las ID_{50} , calculados a partir de las Tablas XX-XXIII por el método descrito para el caso de los productos de la reacción (21,78), se recogen en la **Tabla Resumen III**.

Puede observarse que el sustrato 17α -hidroxipregnenolona no es capaz de inhibir la actividad del enzima de forma apreciable frente a cualquiera de los sustratos utilizados, y sólo a concentraciones $6\ \mu\text{M}$ (seis veces superior) es capaz de inhibir un 50% la actividad del enzima de ovario cuando el sustrato utilizado es pregnenolona. Al mismo tiempo, el

Tabla Resumen III

RESUMEN DE ID_{50} DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN SOBRE LOS OTROS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO

	Testículo				Ovario			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
Pre	-	0.7	4.9	1.6	-	1.2	2.3	2.1
17 α Pre	NC	-	NC	NC	6.0	-	NC	NC
Dhea	0.9	0.4	-	0.8	1.7	0.9	-	1.5
Adiol	9.6	1.0	>10	-	4.5	2.5	>10	-

Los sustratos (fila superior) se utilizaron a una concentración 1 μ M excepto 17 α Pre que fue de 3 μ M. Los sustratos de la reacción usados como inhibidores (1-10 μ M) se presentan en columna. Las ID_{50} (μ M) calculadas por el método descrito en Material y Métodos, se ha obtenido de las tablas XXIV-XXXI. NC: No calculable usando la ecuación de cuatro parámetros descrita, al ajustarse los datos a una recta paralela al eje de ordenadas. En algunos casos, las ID_{50} dadas por el programa son sensiblemente superiores a la concentración máxima de inhibidor (10 μ M) utilizada en los experimentos.

efecto competidor de cada sustrato sobre la actividad del enzima es más aparente cuando se utiliza 17α Pre como sustrato, con un orden de potencia (ID_{50}) idéntico para los dos enzimas (Dhea > Pre > Adiol). La Dhea es un buen inhibidor de todos los sustratos restantes con ID_{50} comprendidas en un rango inferior al de los otros sustratos, tanto en testículo (0.4-0.9 μ M) como en ovario (0.9-1.7 μ M). La capacidad de la Dhea para desplazar a los otros sustratos sigue la secuencia 17α Pre > Adiol $\approx$ Pre en ambos órganos. Le sigue en capacidad inhibitoria Pre, con ID_{50} comprendida entre 0.7-4.9 μ M (testículo) ó 1.2-2.1 μ M (ovario) y un orden de desplazamiento 17α Pre > Adiol > Dhea. El Adiol no aparece como buen competidor por el centro activo del enzima frente al resto de los sustratos, a excepción de 17α Pre (ID_{50} : 1.0 y 2.5 μ M para el enzima de testículo y ovario, respectivamente).

A partir de las K_M para los distintos sustratos y las ID_{50} , se calcularon las K_i para cada sustrato sobre los demás. Los resultados se presentan en la **Tabla Resumen IV**. Puede observarse que existen diferencias en las secuencias de capacidad inhibitoria en testículo (Dhea > Pre > Adiol) y ovario (Pre > Dhea > Adiol). Por otro lado, 17α Pre sólo inhibe con una K_i alta al enzima de ovario cuando se usa Pre como sustrato.

A partir de los valores de K_M^s y V_{max} se determinó la eficacia catalítica (V_{max}/K_M) para cada sustrato y tejido. Los valores se recogen en la **Tabla Resumen V**, y muestran las secuencias Pre > Dhea > Adiol > 17α Pre y Dhea > Pre > Adiol > 17α Pre para testículo y ovario respectivamente.

Tabla Resumen IV

K_i DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN SOBRE LOS OTROS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO

	Testículo				Ovario			
	Pre	17αPre	Dhea	Adiol	Pre	17αPre	Dhea	Adiol
Pre	-	0.38	1.01	0.63	-	0.51	0.26	1.08
17αPre	NC	-	NC	NC	1.24	-	NC	NC
Dhea	0.15	0.22	-	0.32	0.35	0.38	-	0.77
Adiol	1.60	0.54	>2.06	-	0.93	1.06	>1.15	-

Las fila superior representa a los esteroides usados como sustrato de la reacción, mientras que los que actúan como inhibidores se muestran en columna. Los valores de K_i (μM) se determinaron a partir de los valores de K_M^S de cada sustrato (Tabla Resumen II) y de las ID_{50} (Tabla Resumen III), tal y como se detalla en Material y Métodos.

Tabla Resumen V

EFICACIA CATALÍTICA DEL ENZIMA 3 β -HSD DE TESTÍCULO Y OVARIO PARA LOS DIVERSOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN

	Testículo	Ovario
Pre	5.60	23.19
17 α Pre	0.14	0.86
Dhea	2.88	33.90
Adiol	1.84	5.63

Los datos de eficacia catalítica se determinaron a partir de las K_M^S (Tabla Resumen II) y V_{max} (Tabla XXXIIa) aparentes del enzima, asumiendo que $V_{max} = K_{cat} \times E_T$.

10. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN EN PRESENCIA SIMULTÁNEA DE TODOS LOS SUSTRATOS DEL ENZIMA DE TESTÍCULO Y OVARIO

Los experimentos anteriores se complementaron estudiando, además, la velocidad de la reacción del enzima de ovario y testículo en tres situaciones experimentales distintas: i) con cada sustrato individual en un ensayo de reacción estándar, ii) con los cuatro sustratos simultáneamente a concentraciones equivalentes a sus respectivas K_M de los cuales sólo uno estaba marcado isotópicamente, iii) la misma situación anterior, con cada sustrato a concentración saturante ($8 \mu M$).

Los resultados experimentales se recogen en las tablas XXXII a, b y c, y se representan en la figura 32. A efectos ilustrativos, los valores numéricos se representan en la figura como % del valor de la V_{max} del sustrato preferente tomado como 100 %.

Los datos experimentales, cuando se usan los cuatro sustratos individualmente, muestran una secuencia idéntica para las V_{max} de los enzimas de testículo y ovario: $Pre \approx Adiol > Dhea > 17\alpha Pre$.

Al usar mezclas de los cuatro sustratos los resultados no son los mismos y dependen de las concentraciones a las que se estudia la velocidad. Cuando los cuatro sustratos están a concentraciones próximas a K_M , la preferencia del enzima por el sustrato es diferente en testículo ($Adiol > Dhea \approx 17\alpha Pre > Pre$) y ovario ($Adiol > > Pre \approx Dhea > 17\alpha Pre$).

A altas concentraciones de los cuatro sustratos, la secuencia de preferencia difiere de los casos anteriores tanto en testículo ($Dhea > Adiol > > > Pre \approx 17\alpha Pre$) como en ovario ($Dhea > Adiol > > Pre > 17\alpha Pre$). La diferencia más clara entre ambos tejidos estriba en una actividad enzimática remanente para Pre superior a la de $17\alpha Pre$ en el enzima de ovario..

11. EFECTO DE LA FSH Y BUT₂AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA EN CÉLULAS GRANULOSA MANTENIDAS EN CULTIVO PRIMARIO

Se cultivaron CG obtenidas por punción en condiciones estériles de folículos preantrales de ovarios de ratas inmaduras tratadas durante 5 días con DES. Las CG se mantuvieron en cultivo durante 72 horas en presencia de FSH (200 ng/ml) o But₂AMPc (1 mM).

Al final de este periodo las células se lavaron con tampón (50 mM fosfato potásico, 1 mM EDTA, pH 7.4), despegaron por rascado de las placas de cultivo, sonicaron (15 seg, 4 °C) y la actividad 3β-HSD se determinó frente a los cuatro sustratos a concentración saturante (50 μM) de cada uno de ellos. Los resultados de la Tabla XXXIII se representan en la Figura 33. Puede observarse que, independientemente del sustrato utilizado, el tratamiento con FSH o But₂AMPc aumenta la V_{max} aparente del enzima.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla I

RF DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DEL ENZIMA 3 β -HSD

Sustrato	Rf	Producto	Rf
Pregnenolona	0.41	Progesterona	0.61
17 α hidroxipregnenolona	0.32	17 α hidroxiprogesterona	0.39
Dehidroepiandrosterona	0.40	Androstendiona	0.54
Androstendiol	0.32	Testosterona	0.39

Se prepararon cantidades conocidas de los ^3H -sustratos y ^{14}C -productos de la reacción catalizada por el enzima 3 β -HSD. Las mezclas radiactivas se suplementaron con los correspondientes sustratos (25 μg) y productos (5 μg) fríos. La separación se realizó en placas de sílica gel sobre soporte de plástico utilizando el sistema cloroformo:éter (5:1, v/v). Cuando el par sustrato/producto fue Pre/Pro y Dhea/ Δ^4 -Adiona se separaron mediante dos recorridos sucesivos y con tres recorridos cuando eran 17 α Pre/17 α Pro y Adiol/Test. Las placas se secaron y recortaron en porciones de 0.3 cm, y se determinó la radiactividad asociada en un contador de centelleo líquido. En la Figura 1 se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 1

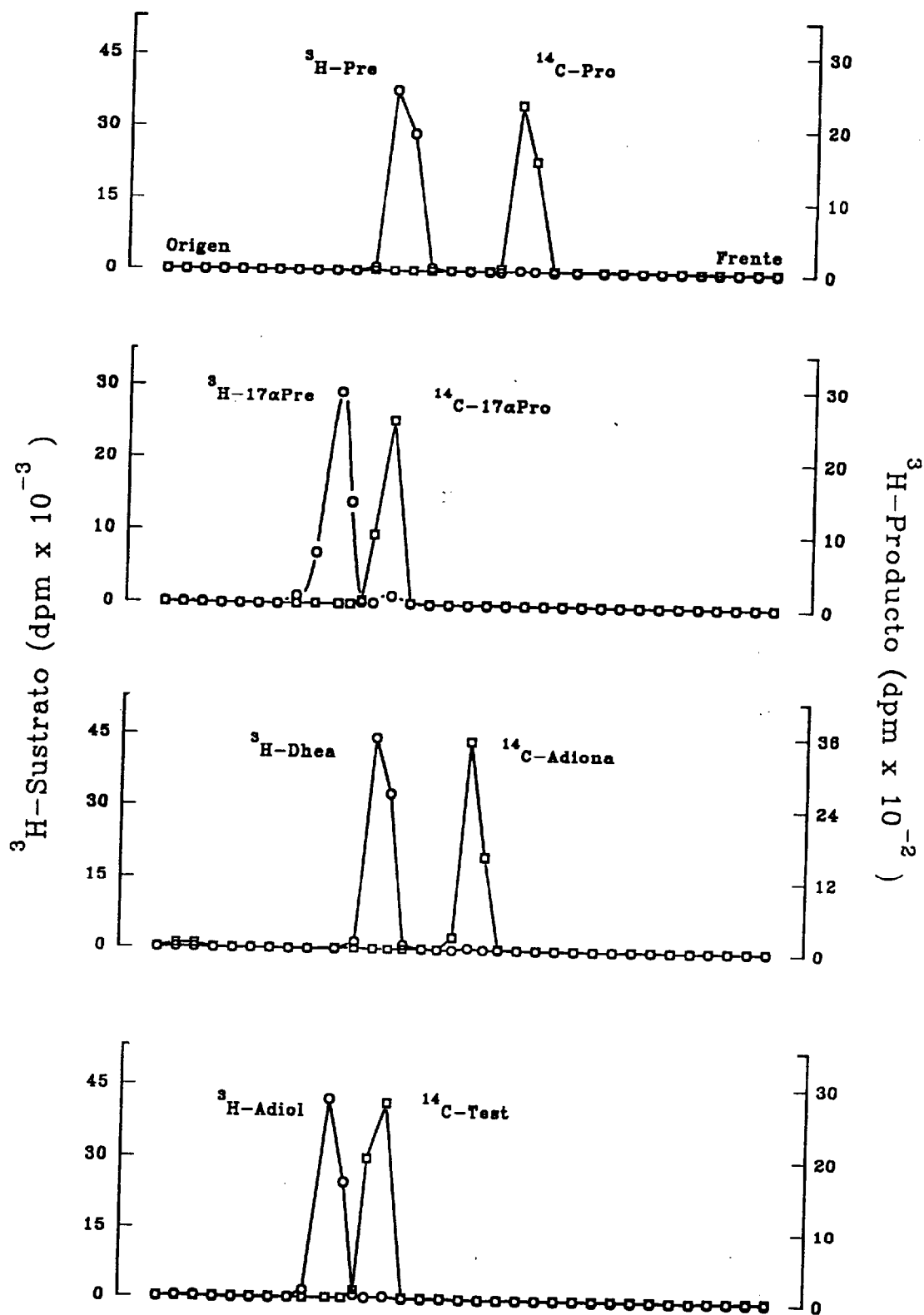


Tabla II

SOLUBILIZACIÓN DEL ENZIMA 3 β -HSD DE MICROSOMAS DE TESTÍCULO Y OVARIO POR DISTINTAS CONCENTRACIONES DE DIFERENTES DETERGENTES

Tratamiento	% Actividad 3 β -HSD	
	Testículo	Ovario
Control	6.1 $\pm$ 1.8	11.9 $\pm$ 4.0
Chaps	% Detergente	
	0.03	5.8 $\pm$ 0.6
	0.1	13.5 $\pm$ 0.6
	0.3	89.2 $\pm$ 3.2
	0.6	19.6 $\pm$ 1.0
	1	18.7 $\pm$ 3.1
Lubrol Px	0.03	63.6 $\pm$ 4.8
	0.1	47.2 $\pm$ 2.1
	0.3	16.4 $\pm$ 1.5
	0.6	10.5 $\pm$ 1.4
	1	7.2 $\pm$ 0.2
		14.3 $\pm$ 1.0
Colato-Na ₂	0.03	2.9 $\pm$ 0.4
	0.1	3.2 $\pm$ 0.7
	0.3	5.3 $\pm$ 0.6
	0.6	8.2 $\pm$ 0.5
	1	6.1 $\pm$ 0.9
		19.5 $\pm$ 0.1
Triton X-100	0.03	20.9 $\pm$ 2.1
	0.1	17.2 $\pm$ 0.6
	0.3	5.0 $\pm$ 0.5
	0.6	3.7 $\pm$ 0.0
	1	6.1 $\pm$ 0.9
		4.5 $\pm$ 0.4

Cont.

Tabla II (Continuación)

Tratamiento		% Actividad 3 β -HSD	
		Testículo	Ovario
Triton N-101	0.03	31.4 $\pm$ 1.4	36.0 $\pm$ 4.0
	0.1	8.6 $\pm$ 1.1	29.7 $\pm$ 2.3
	0.3	2.9 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.8
	0.6	2.1 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.5
	1	-	-
Thesit	0.03	64.2 $\pm$ 4.0	74.0 $\pm$ 4.1
	0.1	32.3 $\pm$ 1.1	64.9 $\pm$ 5.6
	0.3	11.4 $\pm$ 1.7	23.6 $\pm$ 1.6
	0.6	6.7 $\pm$ 0.0	17.0 $\pm$ 0.9
	1	3.5 $\pm$ 0.5	9.1 $\pm$ 0.8
Nonidet P-40	0.03	19.0 $\pm$ 0.9	26.1 $\pm$ 1.0
	0.1	14.6 $\pm$ 0.2	42.6 $\pm$ 1.4
	0.3	3.0 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 0.2
	0.6	1.9 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.7
	1	1.1 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.1
Tween 80	0.03	4.7 $\pm$ 0.2	11.7 $\pm$ 0.3
	0.1	2.6 $\pm$ 0.6	11.6 $\pm$ 0.5
	0.3	6.7 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.3
	0.6	5.2 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.3
	1	6.2 $\pm$ 0.7	5.4 $\pm$ 0.5

El porcentaje de la actividad 3 β -HSD solubilizada se expresó como la relación entre la actividad en el sobrenadante de 100.000 x g y la actividad total, multiplicado por 100. El ensayo se realizó a 37 °C con concentraciones saturantes de pregnenolona (50 μ M) y NAD⁺ (0.6 mM) en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), durante 5 min (testículo) ó 1 min (ovario). En estas condiciones menos del 15% de ³H-pregnenolona es convertida en ³H-progesterona. Se representan las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 2

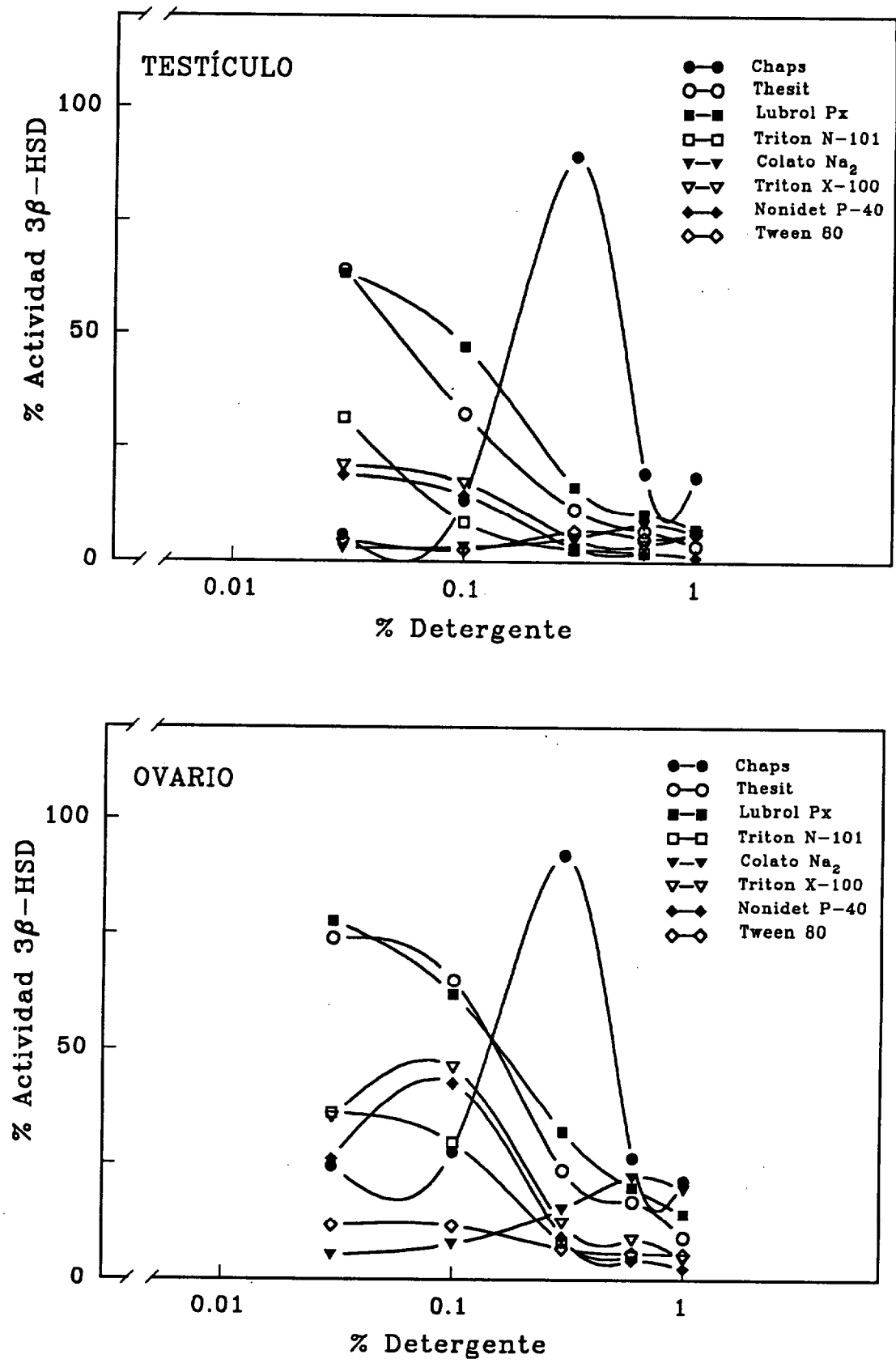


Tabla III

LINEALIDAD RESPECTO AL TIEMPO DE LA TRANSFORMACIÓN DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS POR EL ENZIMA 3 β -HSD DE TESTÍCULO

Tiempo (min)	nmol producto/mg prot			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
1	1.04 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.06	1.57 $\pm$ 0.91	1.96 $\pm$ 0.00
3	3.47 $\pm$ 0.32	2.09 $\pm$ 0.00	2.88 $\pm$ 0.06	4.59 $\pm$ 0.00
5	8.06 $\pm$ 0.78	3.57 $\pm$ 0.08	5.11 $\pm$ 0.06	3.52 $\pm$ 0.65
7	10.16 $\pm$ 0.45	5.90 $\pm$ 0.81	7.60 $\pm$ 0.72	12.45 $\pm$ 0.00
10	17.18 $\pm$ 0.39	9.18 $\pm$ 1.21	11.97 $\pm$ 1.63	15.08 $\pm$ 0.65

La incubación del enzima testicular (1.22-2.44 μ g prot) se realizó en presencia de 3 H-pregnenolona (Pre: 4 μ M), 3 H-17 α -hidroxipregnenolona (17 α Pre: 4 μ M), 3 H-dehidroepiandrosterona (Dhea: 4 μ M) o 3 H-androstendiol (Adiol: 2 μ M) durante tiempos variables (1-10 min) en presencia de concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM) a 37 °C y pH 7.4. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. Se muestra un experimento representativo de otros dos.

Figura 3

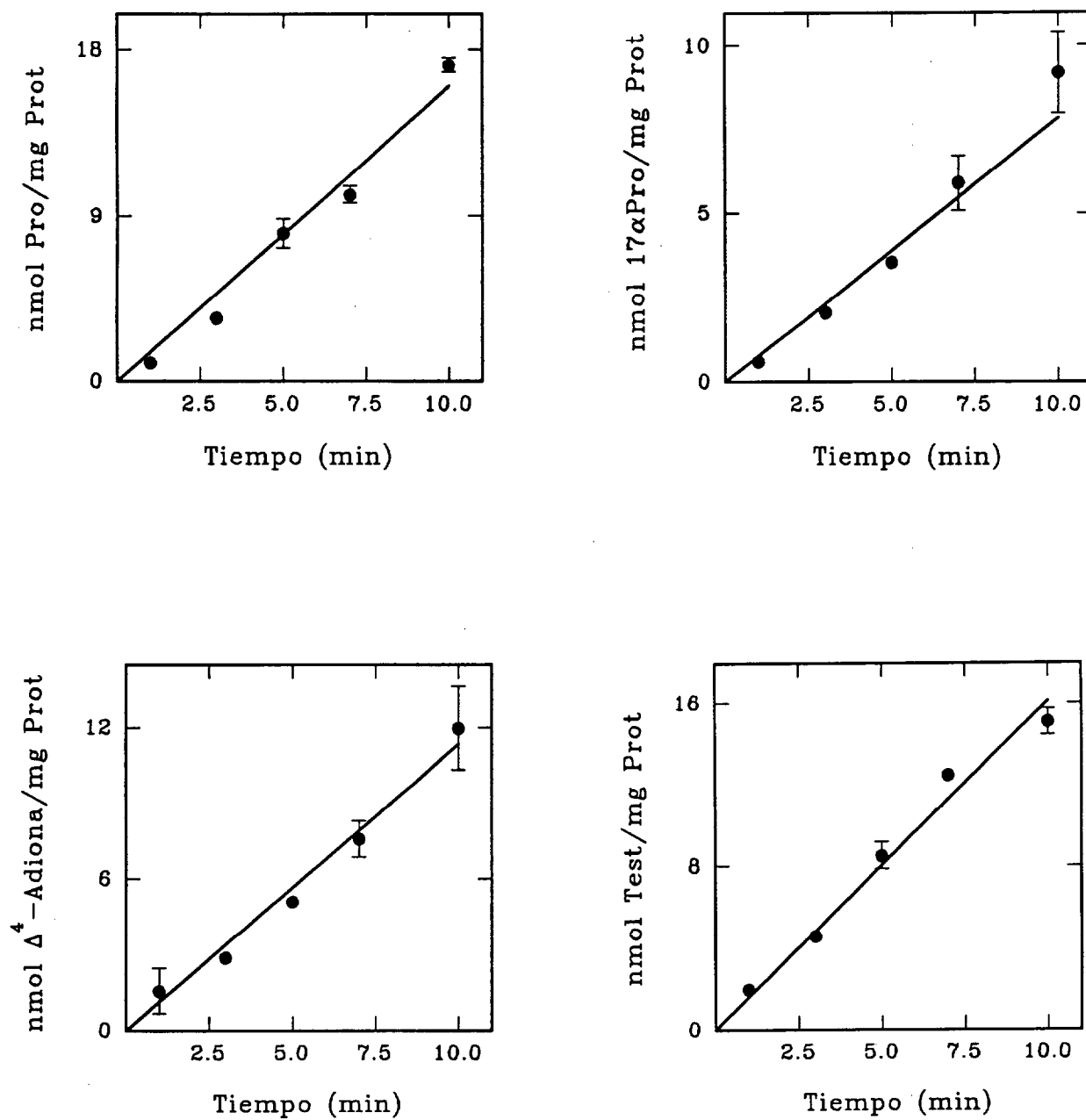


Tabla IV

LINEALIDAD RESPECTO AL TIEMPO DE LA TRANSFORMACIÓN DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS FISIOLÓGICOS POR EL ENZIMA 3 β -HSD DE OVARIO

Tiempo (min)	nmol producto/mg prot			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
1	5.8 $\pm$ 0.5	-	6.5 $\pm$ 1.6	13.3 $\pm$ 0.0
3	26.2 $\pm$ 3.5	-	21.5 $\pm$ 0.7	41.7 $\pm$ 1.7
5	35.7 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 2.0	41.0 $\pm$ 2.3	66.7 $\pm$ 6.7
7	49.8 $\pm$ 1.8	-	60.2 $\pm$ 3.7	95.0 $\pm$ 8.3
10	59.3 $\pm$ 0.3	33.0 $\pm$ 2.0	86.0 $\pm$ 1.3	120.0 $\pm$ 0.0
15	-	44.0 $\pm$ 0.0	-	-
20	-	53.3 $\pm$ 0.0	-	-
25	-	73.3 $\pm$ 0.0	-	-

La incubación del enzima de ovario (0.24 μ g prot) se realizó en presencia de 3 H-pregnenolona (Pre: 4 μ M), 3 H-17 α -hidroxipregnenolona (17 α Pre: 4 μ M), 3 H-dehidroepiandrosterona (Dhea: 4 μ M) o 3 H-androstendiol (Adiol: 2 μ M) durante tiempos variables (1-25 min) en presencia de concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM) a 37 °C y pH 7.4. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 4

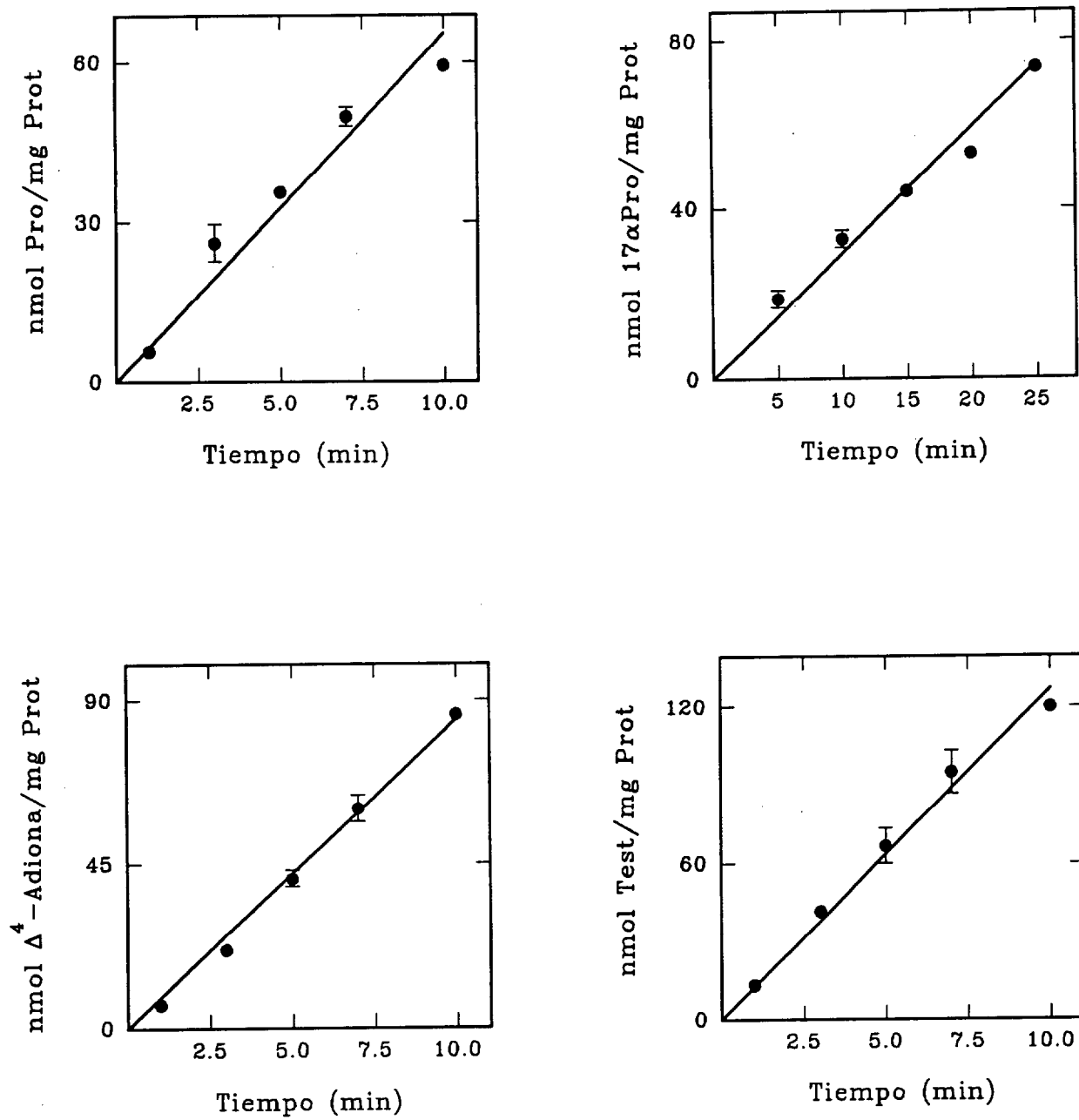


Tabla V

LINEALIDAD DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR EL ENZIMA 3 β -HSD DE TESTÍCULO RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Proteínas (μ g)	(nmol producto/min) $\times 10^3$			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
0.61	0.68 $\pm$ 0.20	0.40 $\pm$ 0.06	1.29 $\pm$ 0.00	1.55 $\pm$ 0.08
1.22	1.50 $\pm$ 0.20	-	1.46 $\pm$ 0.08	3.00 $\pm$ 0.12
1.83	2.46 $\pm$ 0.21	-	2.32 $\pm$ 0.16	4.14 $\pm$ 0.08
2.44	3.94 $\pm$ 0.23	1.92 $\pm$ 0.24	3.94 $\pm$ 0.16	6.91 $\pm$ 0.03
4.88	-	4.60 $\pm$ 0.40	-	-

Se incubaron cantidades crecientes del enzima testicular (0.61-4.88 μ g de proteína) en presencia de concentraciones saturantes (4 μ M) de los sustratos fisiológicos del enzima y NAD⁺ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml. Los tiempos de incubación se fijaron en 7 min (Pre), 10 min (17 α Pre), 5 min (Dhea) y 2.5 min (Adiol). Las reacciones se pararon y los productos de la reacción se resolvieron por CCF y cuantificaron tal y como se detalla en Material y Métodos. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 5

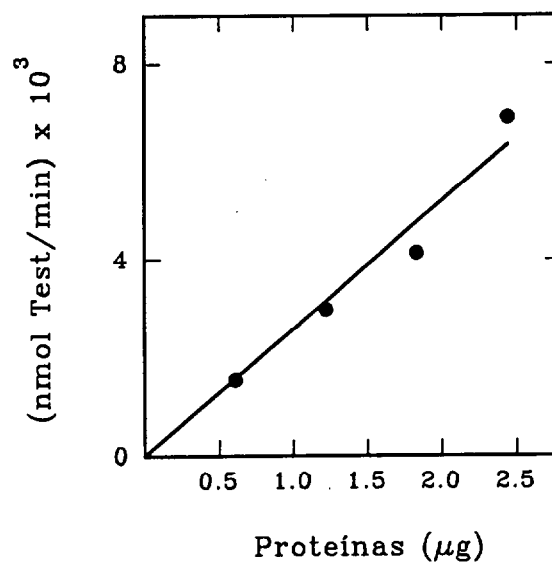
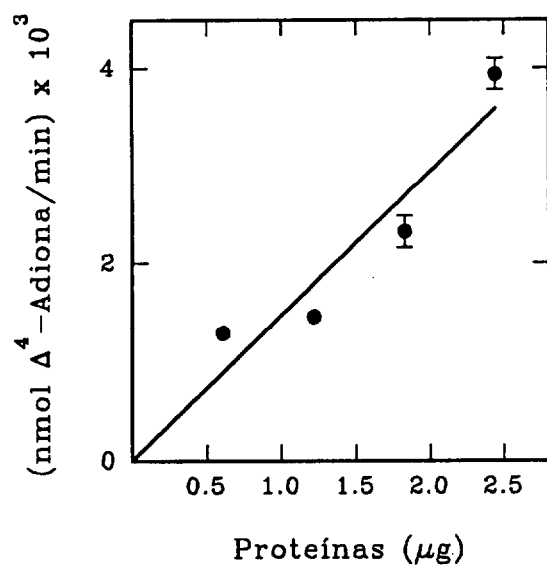
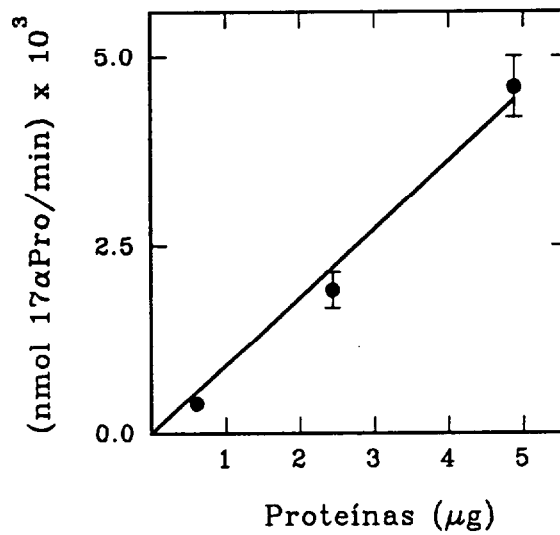
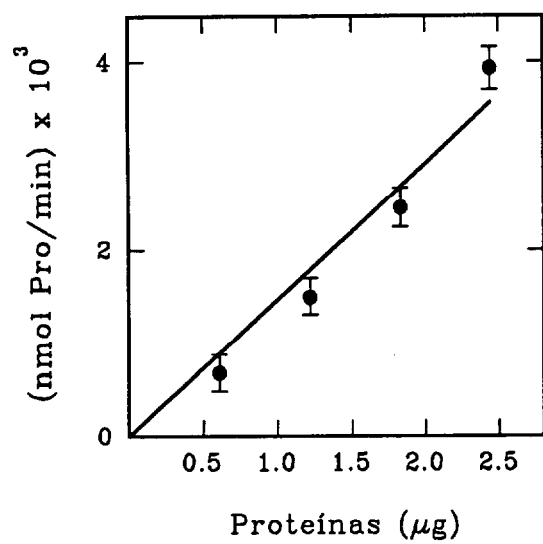


Tabla VI

LINEALIDAD DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR EL ENZIMA 3 β -HSD DE OVARIO RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Proteínas (μ g)	(nmol producto/min) $\times 10^3$			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
0.12	0.80 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.00	1.60 $\pm$ 0.48	2.19 $\pm$ 0.08
0.24	1.80 $\pm$ 0.20	0.73 $\pm$ 0.05	4.00 $\pm$ 0.80	5.12 $\pm$ 0.89
0.36	2.96 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.00	6.09 $\pm$ 0.16	8.57 $\pm$ 0.06
0.48	4.84 $\pm$ 0.26	1.60 $\pm$ 0.40	9.39 $\pm$ 0.80	12.56 $\pm$ 0.03

Se incubaron cantidades crecientes del enzima ovárico (0.12-0.48 μ g de proteína) en presencia de concentraciones saturantes (4 μ M) de los sustratos fisiológicos del enzima y NAD⁺ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml. Los tiempos de incubación se fijaron en 7 min (Pre), 10 min (17 α Pre), 5 min (Dhea) y 2.5 min (Adiol). Las reacciones se pararon y los productos de la reacción se resolvieron por CCF y cuantificaron tal y como se detalla en Material y Métodos. Los resultados se representan como media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 6

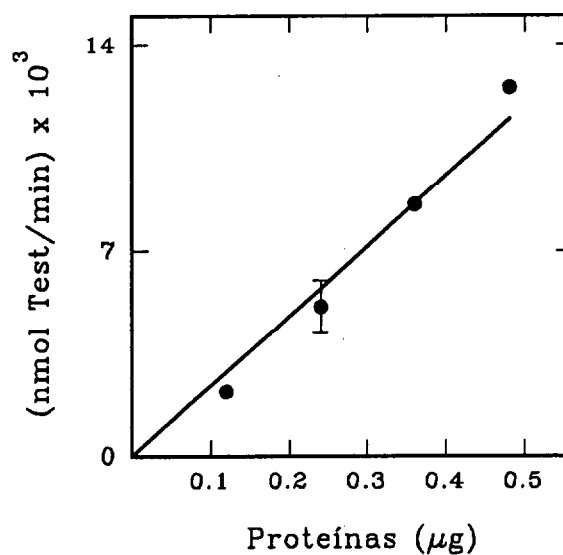
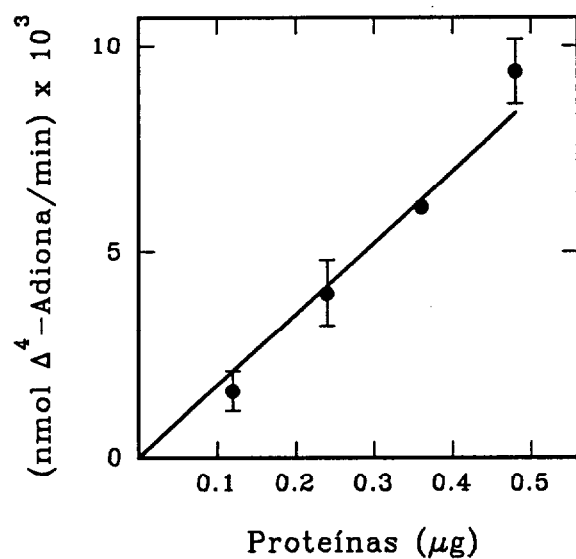
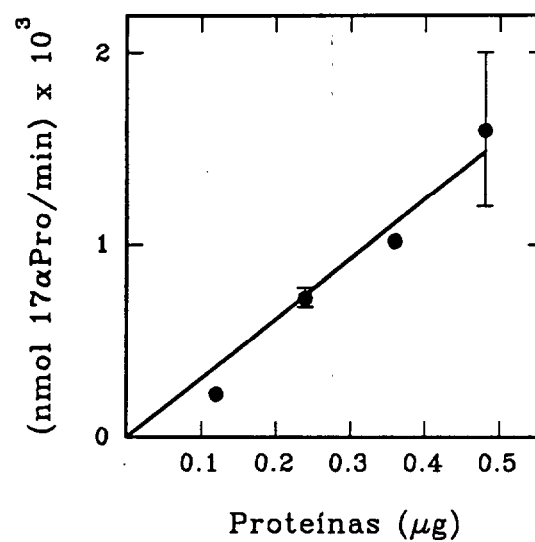
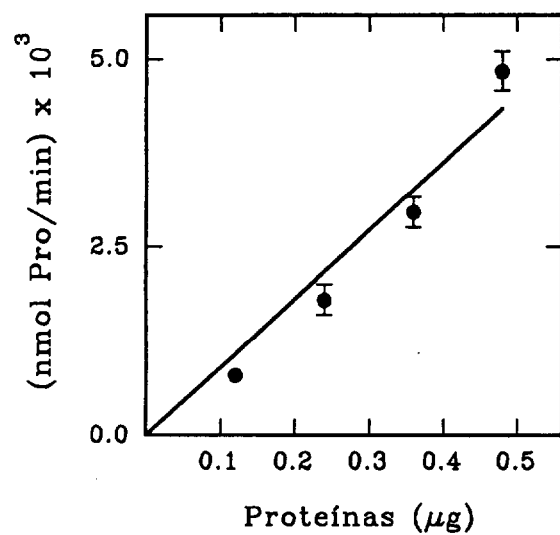


Tabla VII

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD USANDO PREGNENOLONA COMO SUSTRATO

NAD ⁺ (mM)	nmol Pro/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.025	0.37 $\pm$ 0.03	1.73 $\pm$ 0.02
0.05	0.64 $\pm$ 0.00	3.18 $\pm$ 0.27
0.1	0.96 $\pm$ 0.11	5.79 $\pm$ 0.50
0.3	1.21 $\pm$ 0.20	6.89 $\pm$ 0.19
0.6	1.44 $\pm$ 0.10	9.75 $\pm$ 0.25
1.2	1.43 $\pm$ 0.01	12.66 $\pm$ 0.41
2.4	1.61 $\pm$ 0.09	12.83 $\pm$ 0.83

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de NAD⁺ (0.025-2.4 mM) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando ³H-pregnenolona (4 μ M) como sustrato. La reacción se realizó en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos y el % de conversión de ³H-pregnenolona en producto no sobrepasó en ningún caso el 15%. Se representa la media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 7

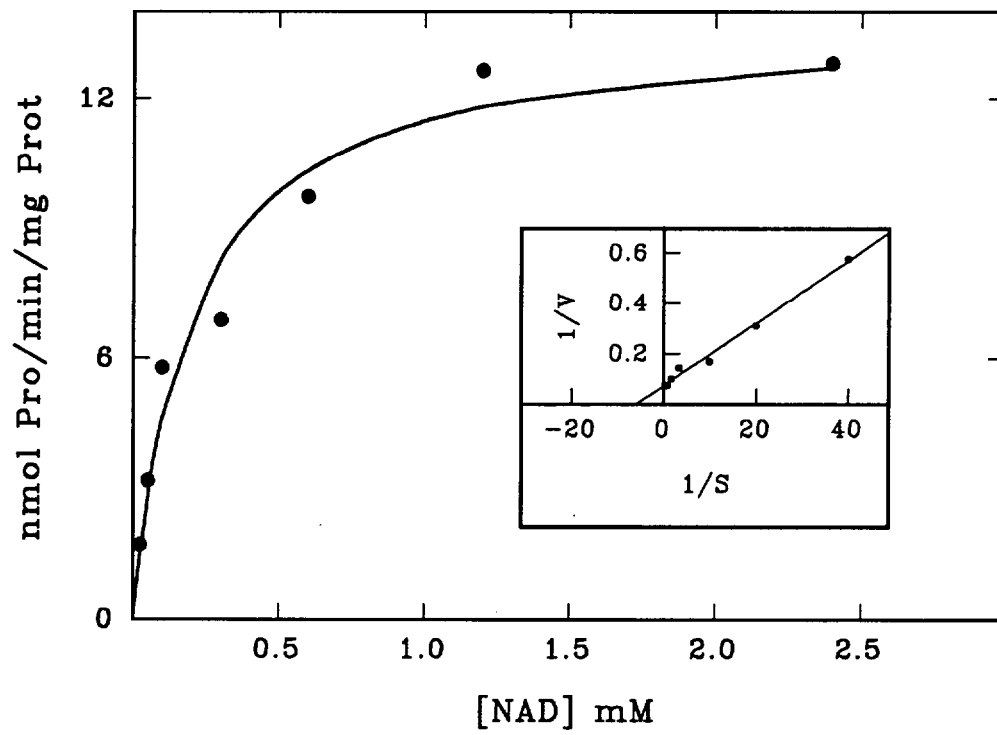
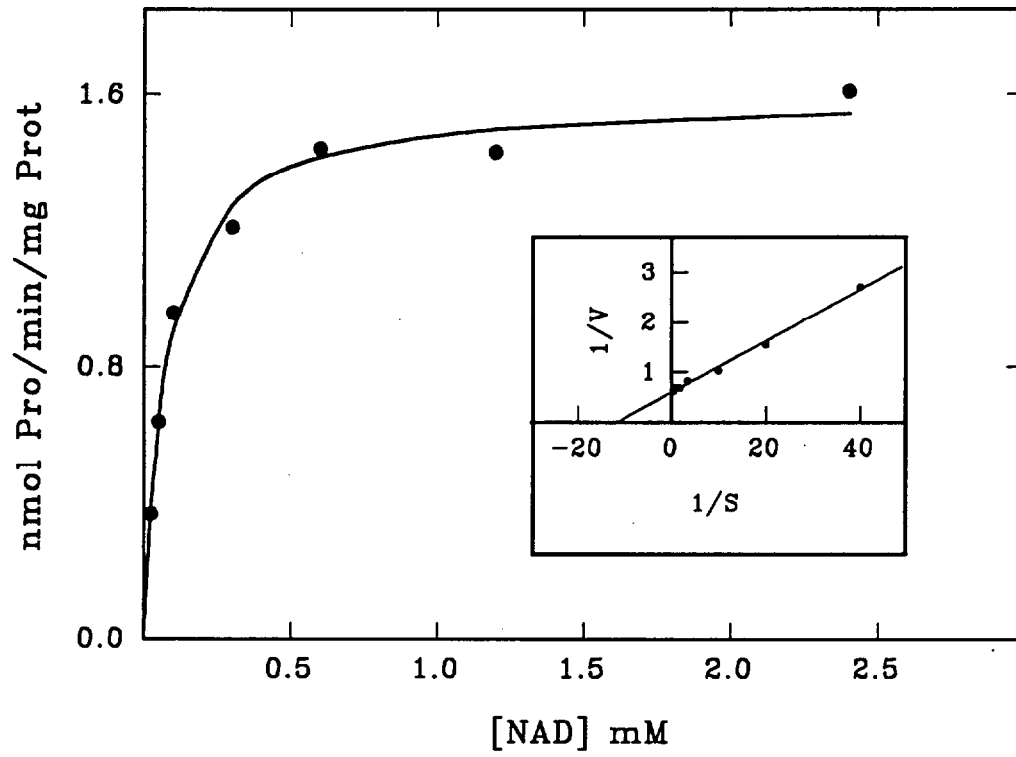


Tabla VIII

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD USANDO 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA COMO SUSTRATO

NAD ⁺ (mM)	nmol 17 α Pro/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.05	0.18 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.10
0.10	0.34 $\pm$ 0.04	1.38 $\pm$ 0.00
0.30	0.68 $\pm$ 0.09	2.52 $\pm$ 0.02
0.60	0.90 $\pm$ 0.00	3.08 $\pm$ 0.46
1.20	0.98 $\pm$ 0.01	3.23 $\pm$ 0.27
2.40	1.04 $\pm$ 0.00	3.67 $\pm$ 0.21

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de NAD⁺ (0.025-2.4 mM) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando como sustrato 16 μ M (testículo) y 8 μ M (ovario) de ³H-17 α -hidroxipregnenolona. La reacción se realizó en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos y el % de conversión de ³H-17 α -hidroxipregnenolona en producto no sobrepasó en ningún caso el 15%. Se presenta la media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 8

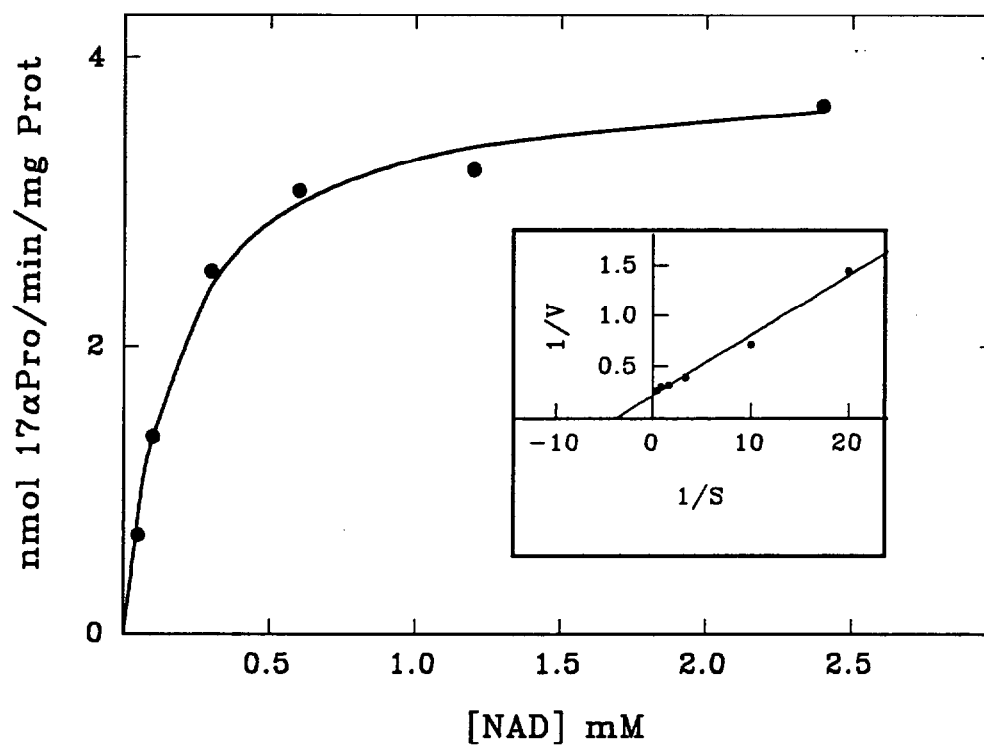
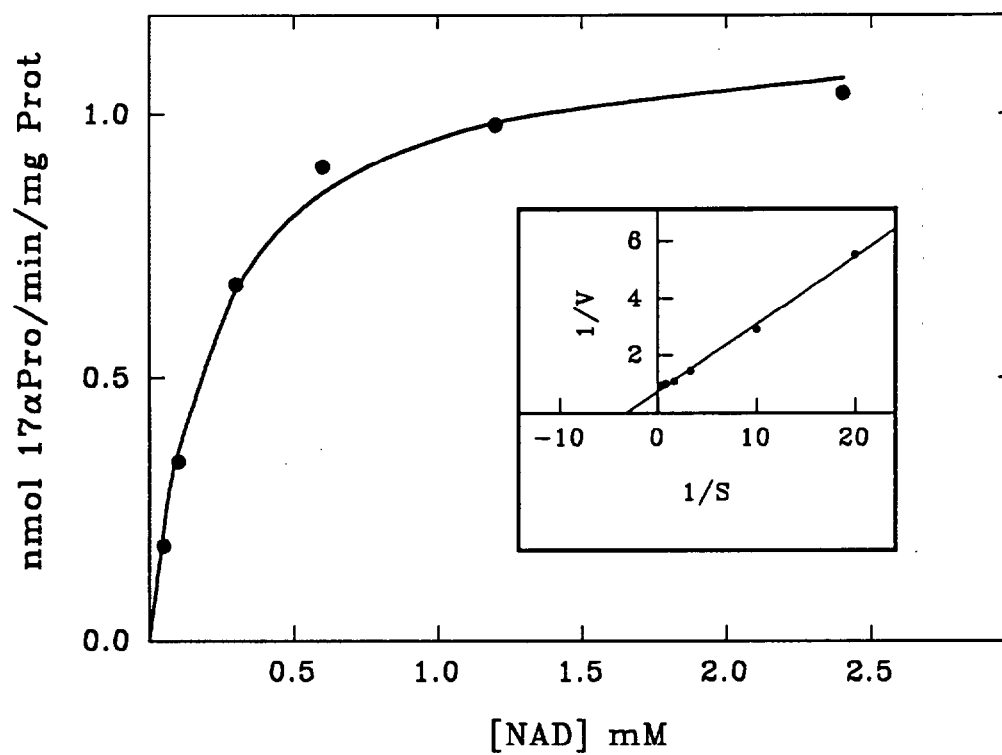


Tabla IX

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD USANDO DEHIDROEPIANDROSTERONA COMO SUSTRATO

NAD ⁺ (mM)	nmol Δ^4 -Adiona/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.0125	0.28 $\pm$ 0.01	-
0.025	0.38 $\pm$ 0.01	3.66 $\pm$ 0.35
0.05	0.51 $\pm$ 0.04	5.25 $\pm$ 0.31
0.10	0.62 $\pm$ 0.00	8.20 $\pm$ 0.27
0.30	-	9.33 $\pm$ 0.31
0.60	0.86 $\pm$ 0.00	11.12 $\pm$ 0.23
1.20	0.85 $\pm$ 0.02	11.52 $\pm$ 0.16

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de NAD⁺ (0.0125-1.2 mM) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando ³H-dehidroepiandrosterona (4 μ M) como sustrato. La reacción se realizó en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos y el % de conversión de ³H-dehidroepiandrosterona en producto no sobrepasó en ningún caso el 15%. Se representa la media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 9

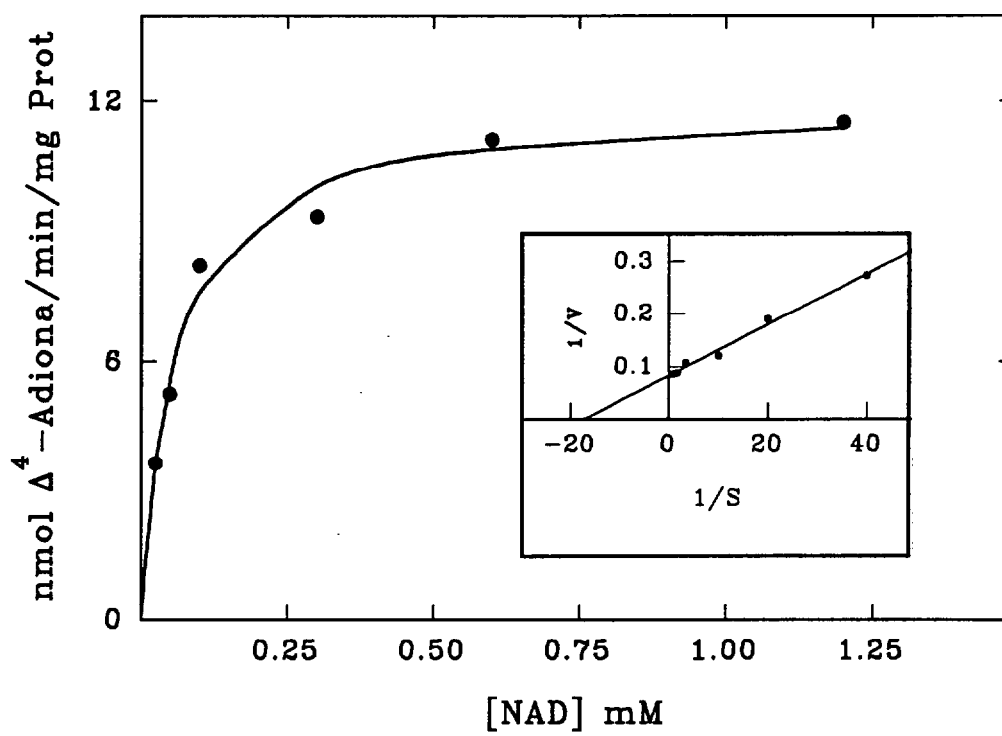
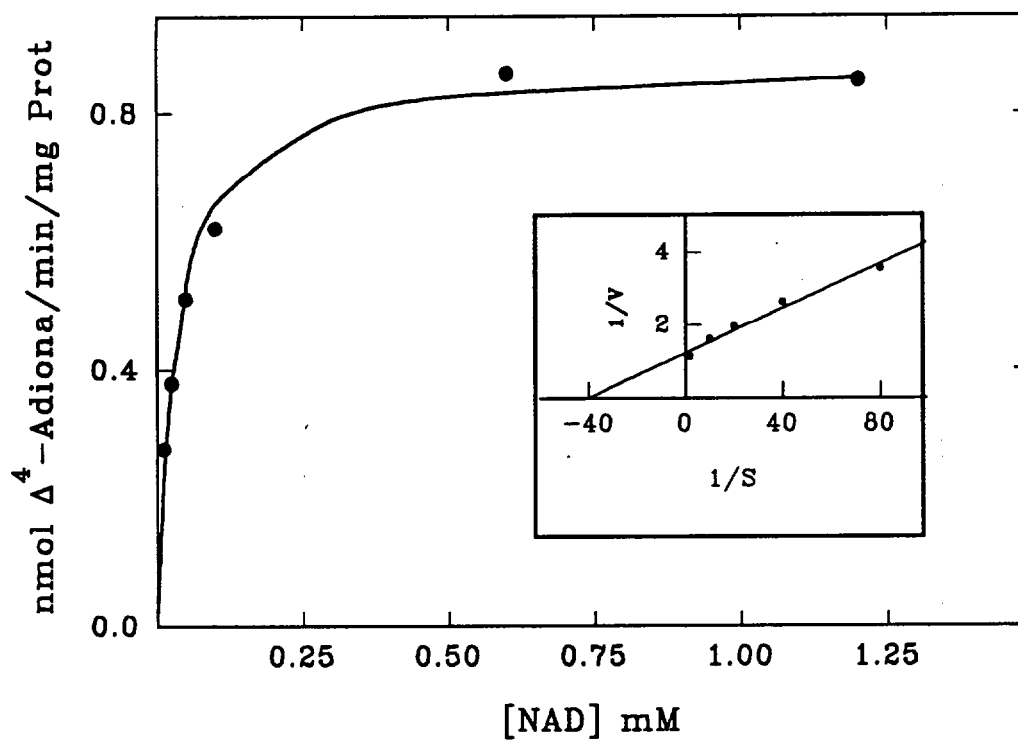


Tabla X

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NAD⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DEL
ENZIMA 3 β -HSD USANDO ANDROSTENDIOL COMO SUSTRATO**

NAD ⁺ (mM)	nmol Test/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.025	0.41 $\pm$ 0.01	3.02 $\pm$ 0.06
0.05	0.86 $\pm$ 0.08	4.64 $\pm$ 0.19
0.10	1.20 $\pm$ 0.01	5.79 $\pm$ 0.33
0.30	1.43 $\pm$ 0.02	10.54 $\pm$ 0.21
0.60	1.70 $\pm$ 0.02	11.29 $\pm$ 1.20
1.20	1.90 $\pm$ 0.07	12.73 $\pm$ 0.85
2.40	1.93 $\pm$ 0.00	13.00 $\pm$ 1.08

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de NAD⁺ (0.025-2.4 mM) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando como sustrato ³H-androstendiol 4 μ M (testículo) y 8 μ M (ovario). La reacción se realizó en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos y el % de conversión de ³H-androstendiol en producto no sobrepasó en ningún caso el 15%. Se representa la media $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 10

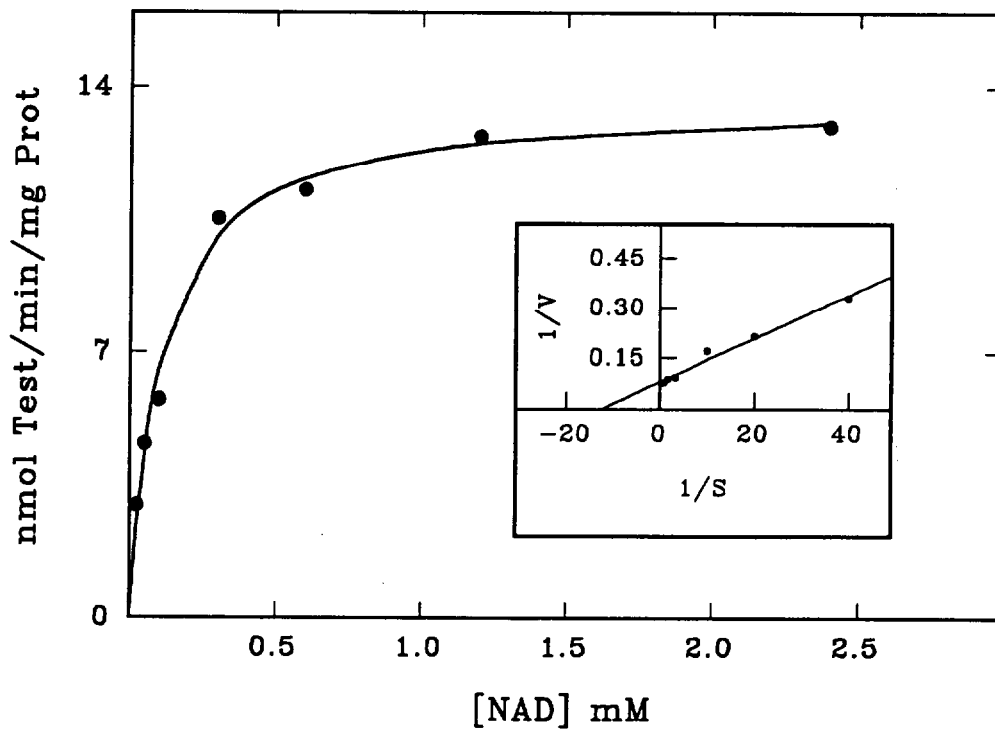
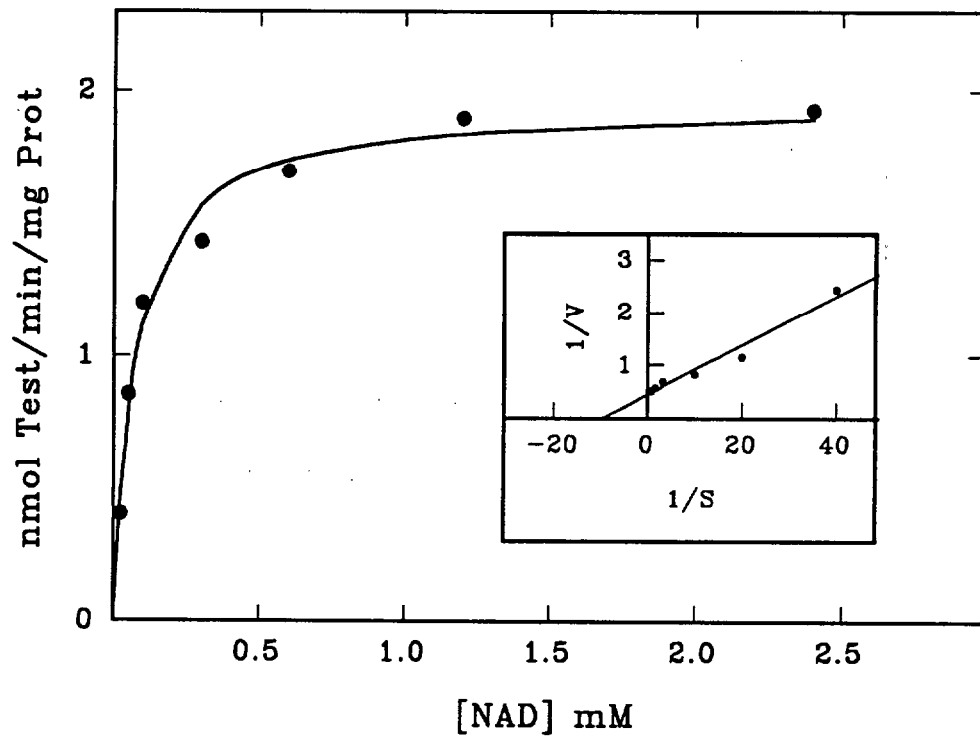


Tabla XI

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PREGNENOLONA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD

Pre (μ M)	nmol Pro/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.10	0.24 $\pm$ 0.00	2.82 $\pm$ 0.19
0.15	0.30 $\pm$ 0.02	4.00 $\pm$ 0.07
0.20	0.38 $\pm$ 0.06	4.88 $\pm$ 0.04
0.30	0.48 $\pm$ 0.02	5.76 $\pm$ 0.04
0.40	0.51 $\pm$ 0.06	6.70 $\pm$ 0.21
0.60	0.57 $\pm$ 0.08	8.28 $\pm$ 0.43
1.00	0.59 $\pm$ 0.03	8.51 $\pm$ 0.22
2.00	0.67 $\pm$ 0.02	9.01 $\pm$ 0.98
4.00	-	10.07 $\pm$ 1.59

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes del sustrato 3 H-pregnenolona (0.1-4 μ M) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 1 minuto. Se representan las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 11

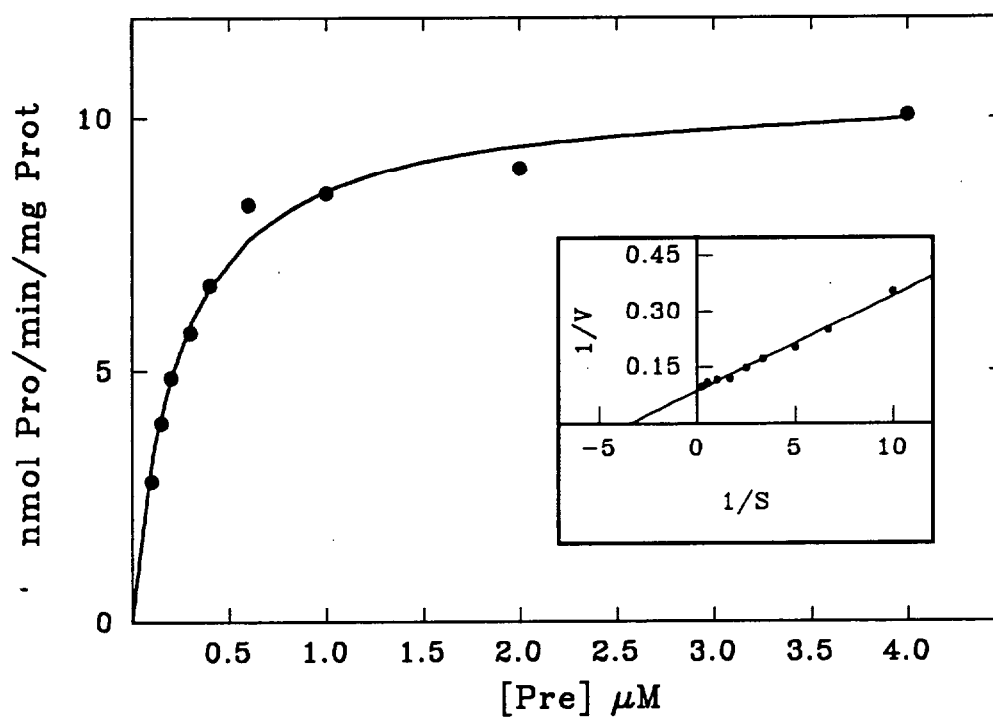
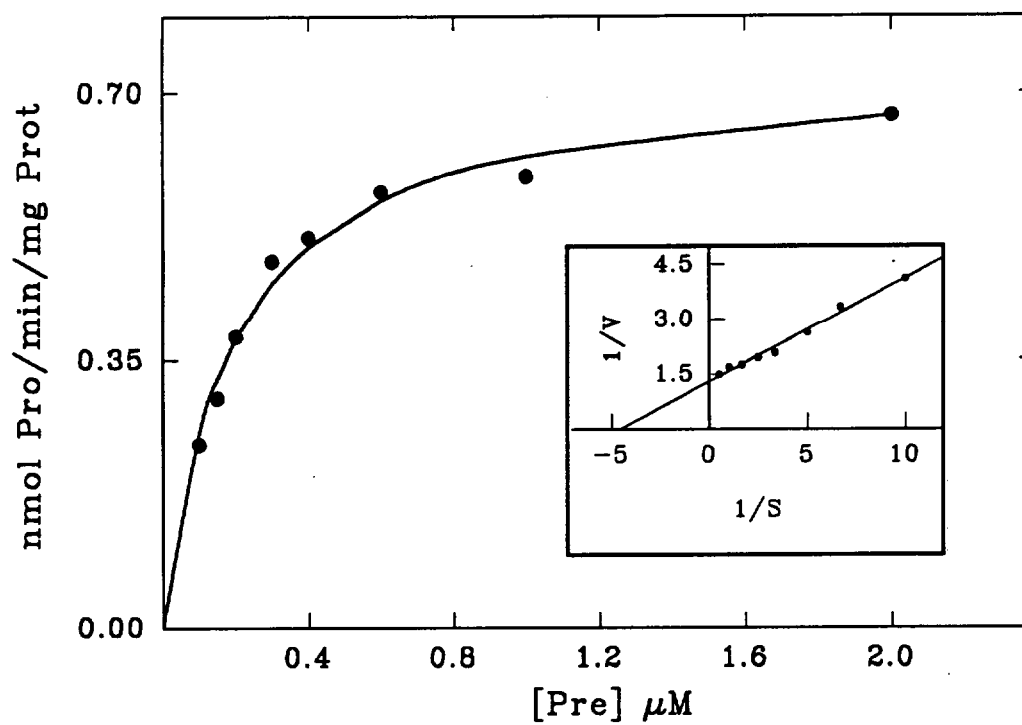


Tabla XII

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD

17 α Pre (μ M)	nmol 17 α Pro/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.6	-	0.50 $\pm$ 0.01
1.0	-	0.73 $\pm$ 0.03
1.5	0.40 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.04
2.0	-	1.19 $\pm$ 0.00
3.0	0.65 $\pm$ 0.01	-
4.0	0.71 $\pm$ 0.05	1.58 $\pm$ 0.05
8.0	0.95 $\pm$ 0.04	1.85 $\pm$ 0.15
16.0	1.12 $\pm$ 0.11	2.33 $\pm$ 0.12
32.0	1.33 $\pm$ 0.12	-

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes del sustrato 3 H-17 α -hidroxipregnenolona (0.6-32 μ M) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 5 min (testículo) y 20 min (ovario). Se representan las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 12

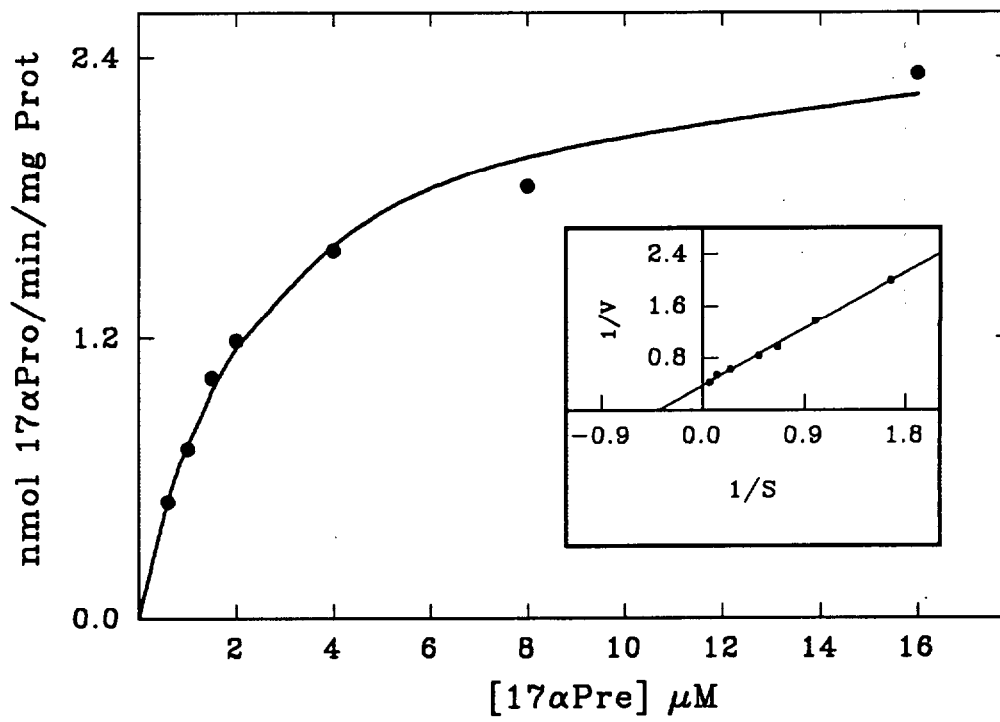
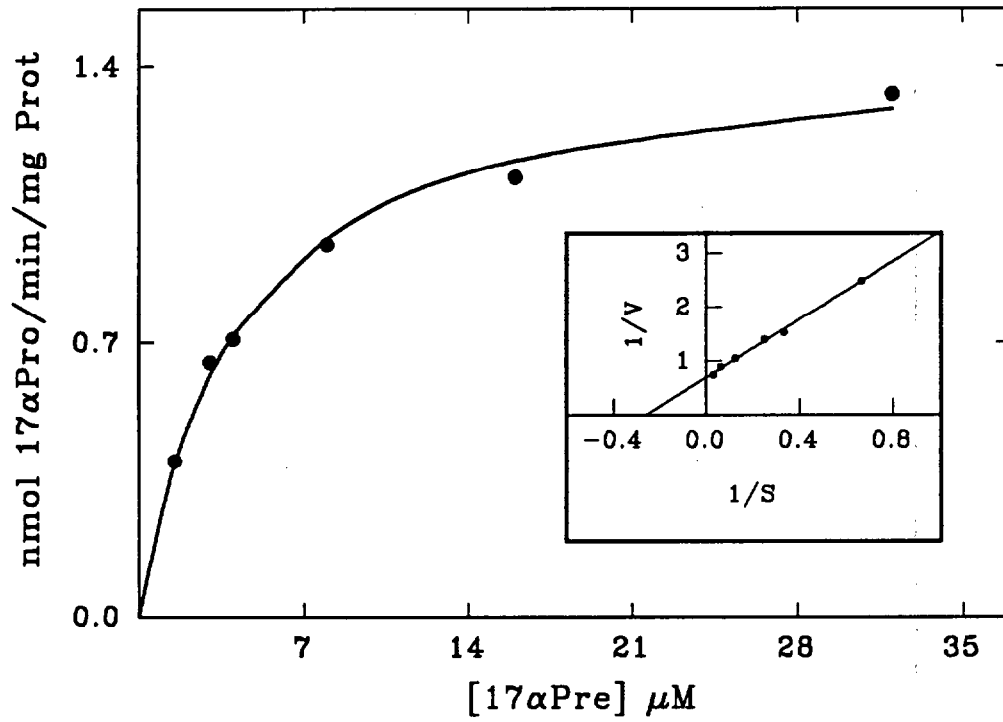


Tabla XIII

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE
LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD**

Dhea (μ M)	nmol Δ^4 -Adiona/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.1	-	4.00 $\pm$ 0.29
0.15	-	4.96 $\pm$ 0.05
0.2	1.77 $\pm$ 0.09	5.82 $\pm$ 0.34
0.3	-	6.92 $\pm$ 0.34
0.4	2.82 $\pm$ 0.09	7.64 $\pm$ 0.37
0.6	-	8.21 $\pm$ 0.13
0.8	3.35 $\pm$ 0.05	-
1	-	8.86 $\pm$ 1.20
1.5	3.88 $\pm$ 0.14	-
2	-	9.16 $\pm$ 2.16
4	3.80 $\pm$ 0.13	-

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes del sustrato 3 H-dehidroepiandrosterona (0.1-4 μ M) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 1 min. Se representan las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 13

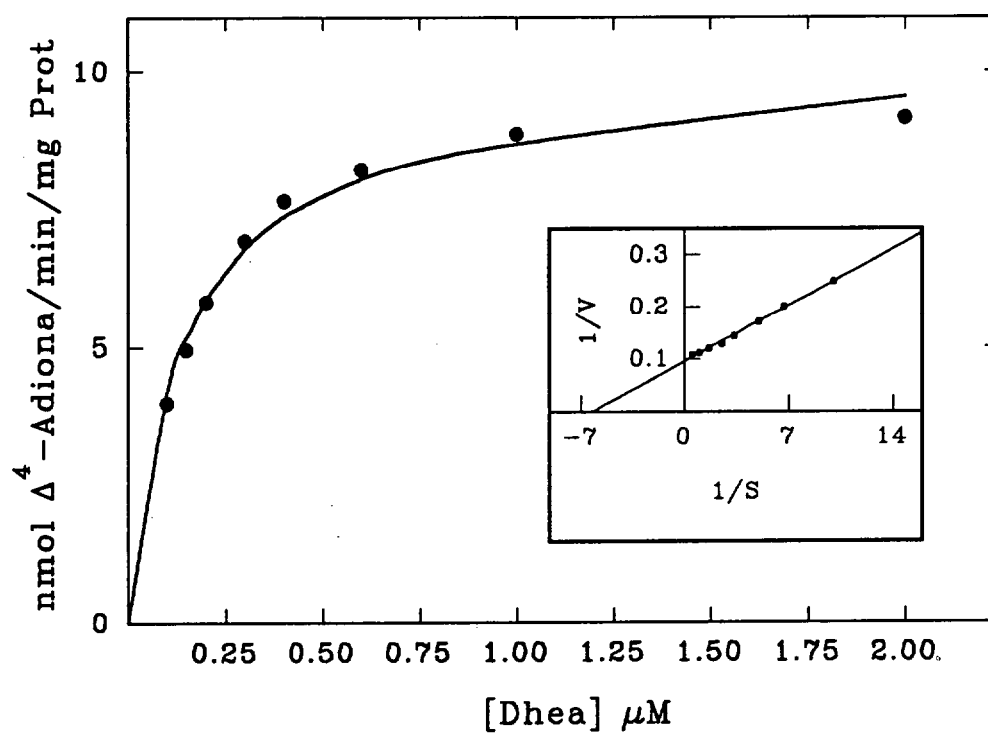
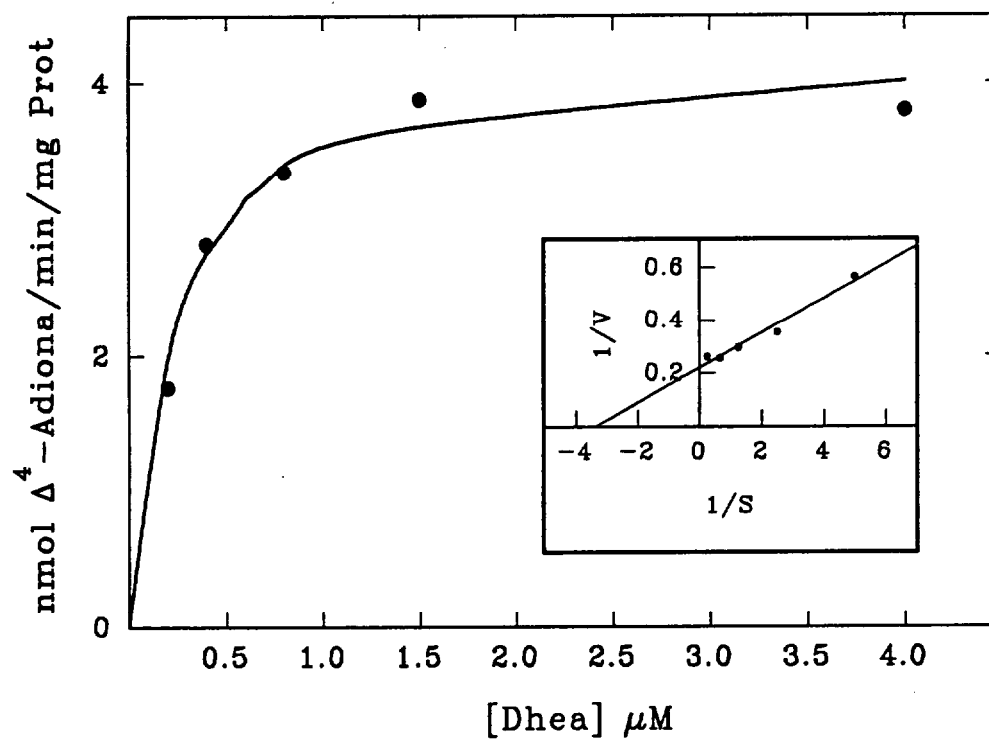


Tabla XIV

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ANDROSTENDIOL SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD

Adiol (μ M)	nmol Test/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
0.2	0.64 $\pm$ 0.01	5.33 $\pm$ 0.13
0.4	0.99 $\pm$ 0.07	9.74 $\pm$ 0.54
0.6	1.35 $\pm$ 0.01	13.34 $\pm$ 0.08
0.8	1.51 $\pm$ 0.02	15.77 $\pm$ 0.67
1	-	15.75 $\pm$ 0.03
1.5	1.77 $\pm$ 0.08	20.71 $\pm$ 0.13
2	-	21.84 $\pm$ 0.42
4	2.19 $\pm$ 0.10	25.62 $\pm$ 2.05

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes del sustrato 3 H-androstendiol (0.2-4 μ M) sobre la actividad del enzima 3 β -HSD de testículo (1.22 μ g de proteína) y ovario (0.24 μ g de proteína) utilizando concentraciones saturantes de NAD $^+$ (0.6 mM), en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C. El tiempo de reacción se fijó en 2.5 min. Se representan las medias $\pm$ SEM de un experimento representativo de otros dos.

Figura 14

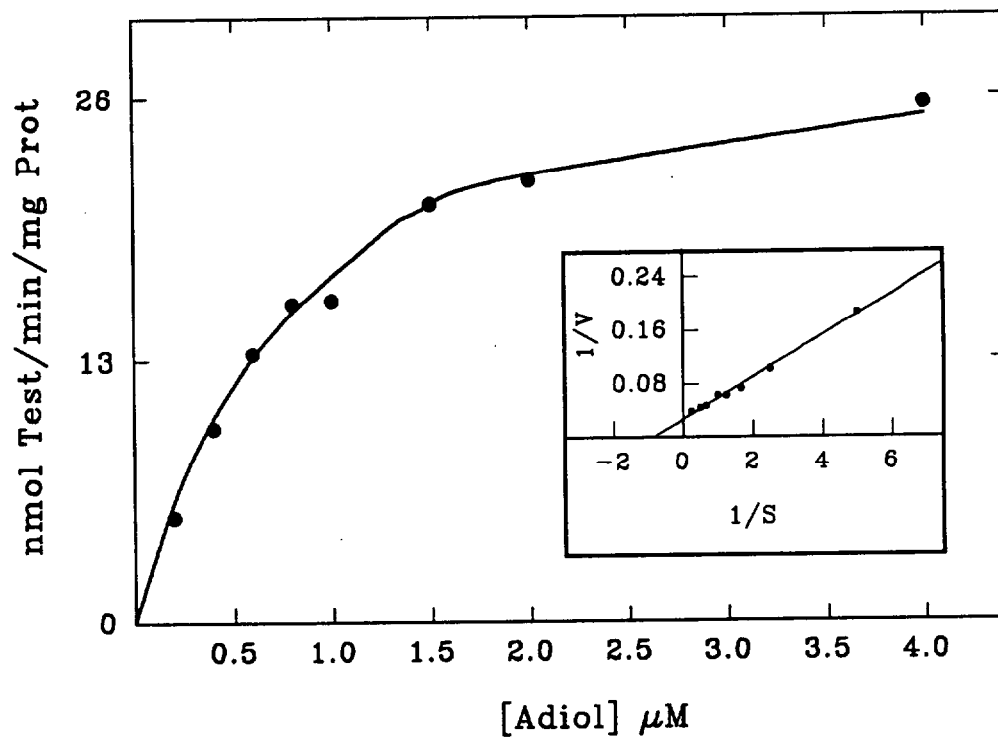
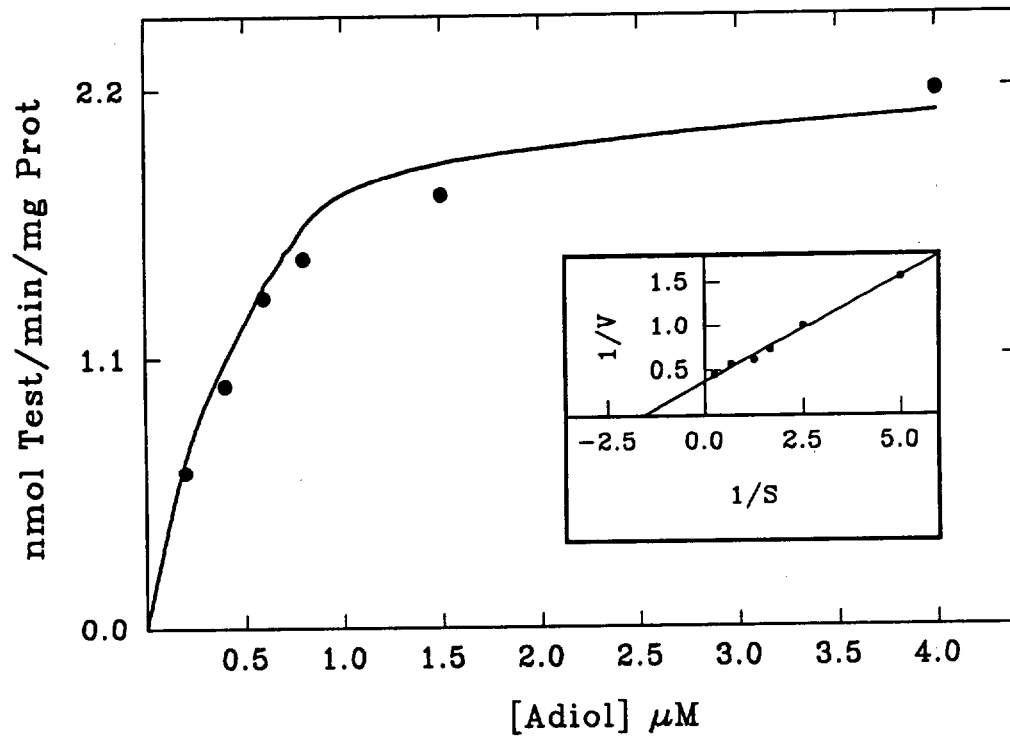


Tabla XV

**EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD TESTICULAR DE
LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON PREGNENOLONA
COMO SUSTRATO**

(μM)	Pro	% Actividad 3 β -HSD		Test
		17 α Pro	Δ^4 -Adiona	
0.0	100.0 $\pm$ 13.2	100.0 $\pm$ 13.2	100.0 $\pm$ 13.2	100.0 $\pm$ 13.2
0.1	97.6 $\pm$ 2.9	98.8 $\pm$ 3.0	101.1 $\pm$ 4.7	91.7 $\pm$ 1.8
0.3	96.4 $\pm$ 0.6	82.3 $\pm$ 0.0	96.4 $\pm$ 0.0	87.0 $\pm$ 1.2
1.0	103.5 $\pm$ 8.8	91.7 $\pm$ 3.5	102.3 $\pm$ 8.2	81.1 $\pm$ 1.8
3.0	87.0 $\pm$ 3.5	98.8 $\pm$ 3.0	92.9 $\pm$ 3.0	82.3 $\pm$ 0.0
10.0	89.4 $\pm$ 4.7	84.7 $\pm$ 0.6	81.1 $\pm$ 2.4	83.5 $\pm$ 3.0

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) en presencia de ³H-pregnenolona (1 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 2 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 15

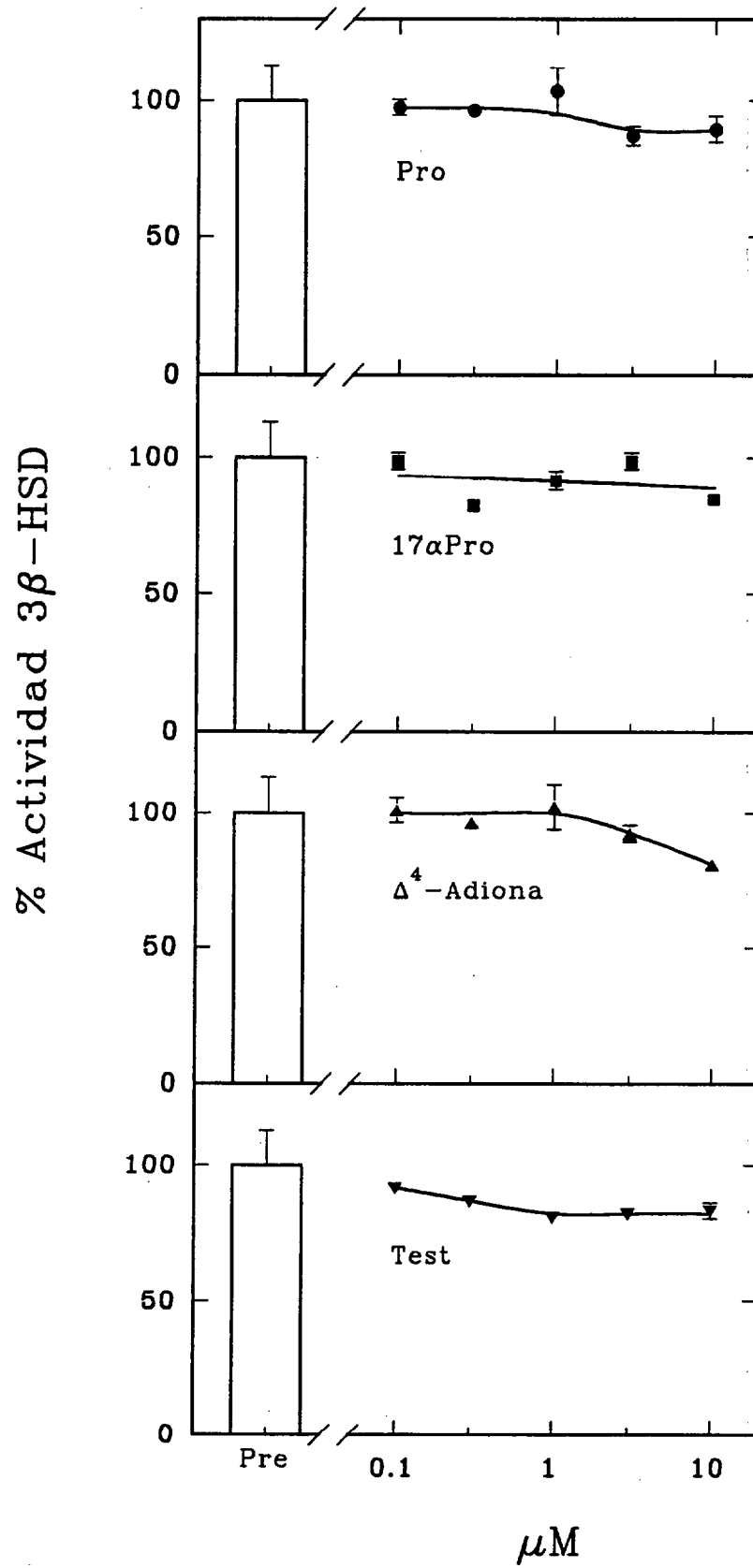


Tabla XVI

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD OVÁRICA DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON PREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 18.5	100.0 $\pm$ 18.5	100.0 $\pm$ 18.5	100.0 $\pm$ 18.5
0.1	88.4 $\pm$ 9.6	75.0 $\pm$ 10.6	100.0 $\pm$ 1.4	79.8 $\pm$ 5.8
0.3	80.7 $\pm$ 15.4	84.6 $\pm$ 1.9	104.8 $\pm$ 6.2	64.4 $\pm$ 1.0
1.0	75.0 $\pm$ 7.2	73.0 $\pm$ 5.8	99.0 $\pm$ 5.3	72.1 $\pm$ 7.7
3.0	71.1 $\pm$ 2.4	82.7 $\pm$ 1.9	92.3 $\pm$ 9.2	51.9 $\pm$ 21.1
10.0	56.7 $\pm$ 2.9	65.4 $\pm$ 3.4	71.1 $\pm$ 6.7	58.6 $\pm$ 1.0

Se incubó el enzima de ovario (0.24 μg de proteína) en presencia de ³H-pregnenolona (1 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 2 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 16

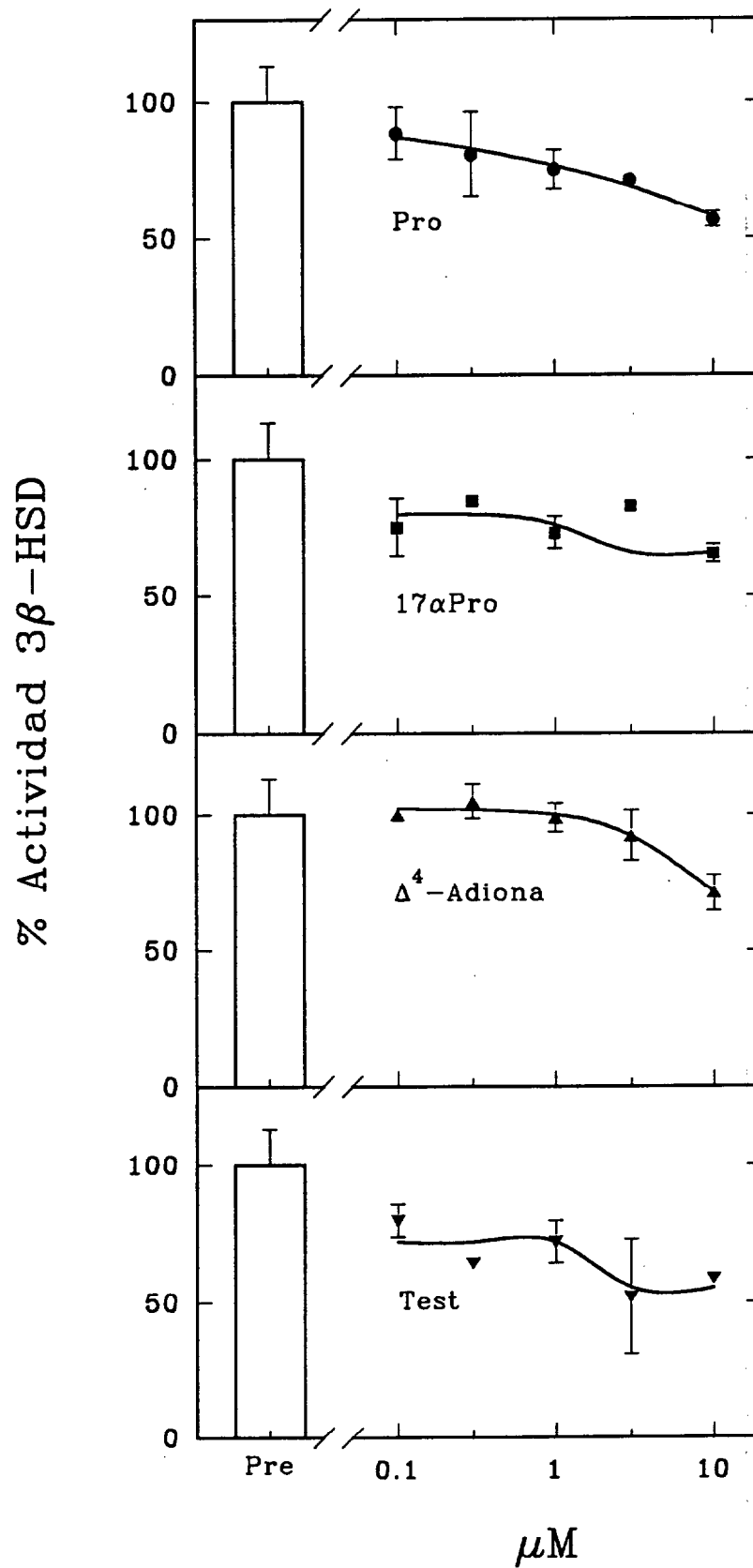


Tabla XVII

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD TESTICULAR DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 A-Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 23.3	100.0 $\pm$ 23.3	100.0 $\pm$ 23.3	100.0 $\pm$ 23.3
0.3	96.6 $\pm$ 2.8	96.6 $\pm$ 0.9	93.8 $\pm$ 5.5	83.7 $\pm$ 0.9
1.0	92.9 $\pm$ 2.8	95.7 $\pm$ 3.7	92.9 $\pm$ 2.8	85.5 $\pm$ 2.8
3.0	93.8 $\pm$ 1.8	95.7 $\pm$ 1.8	81.0 $\pm$ 5.5	69.0 $\pm$ 0.9
10.0	81.9 $\pm$ 2.8	99.3 $\pm$ 5.5	69.0 $\pm$ 4.6	72.7 $\pm$ 0.9
30.0	49.7 $\pm$ 12.9	80.0 $\pm$ 8.3	53.3 $\pm$ 1.9	58.9 $\pm$ 1.8

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) en presencia de ³H-17 α -hidroxipregnenolona (3 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.3-30 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 15 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 17

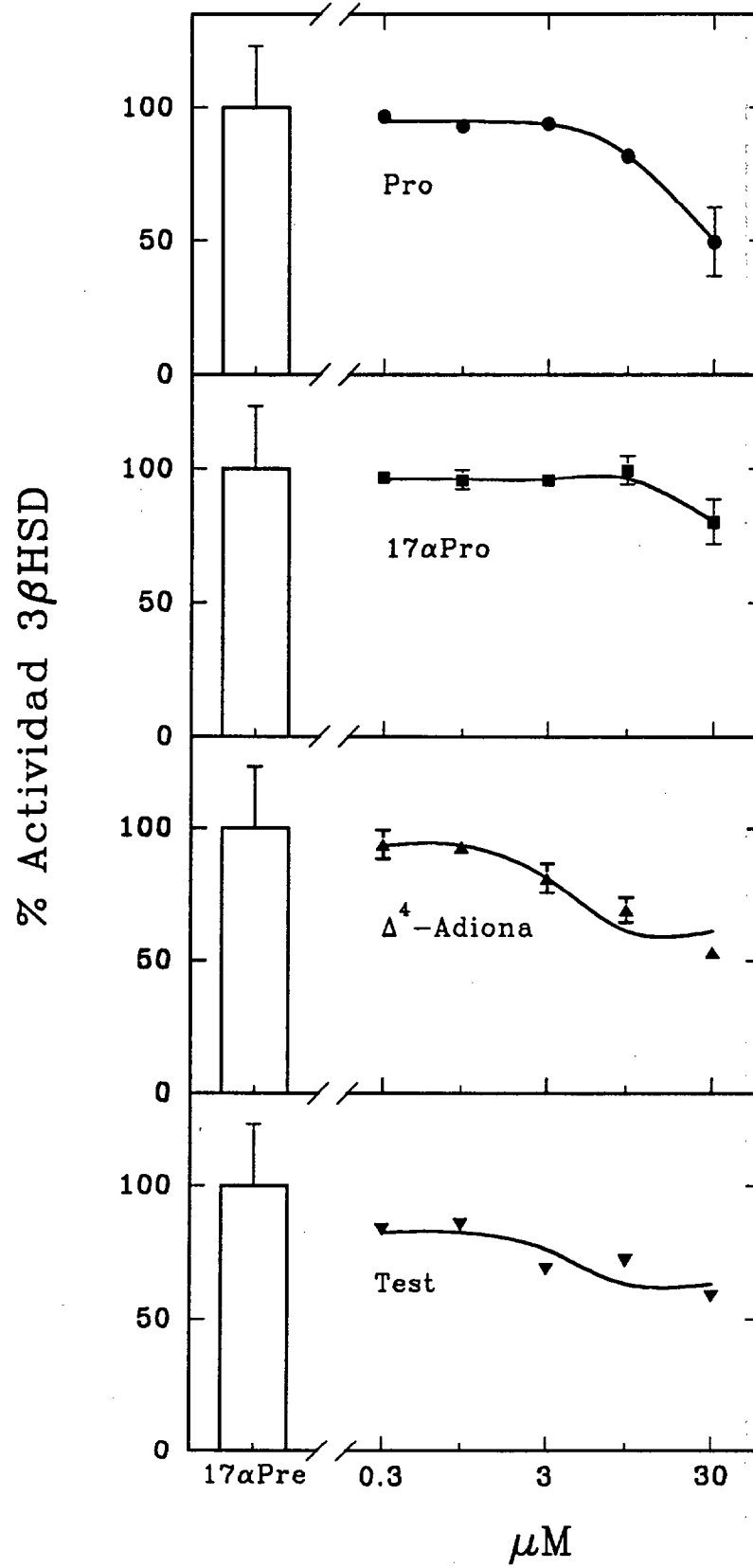


Tabla XVIII

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD OVÁRICA DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 10.1	100.0 $\pm$ 10.1	100.0 $\pm$ 10.1	100.0 $\pm$ 10.1
0.3	76.1 $\pm$ 9.5	122.7 $\pm$ 11.1	95.2 $\pm$ 4.8	104.7 $\pm$ 14.2
1.0	102.3 $\pm$ 7.1	127.9 $\pm$ 6.1	78.5 $\pm$ 7.1	119.0 $\pm$ 4.8
3.0	102.3 $\pm$ 11.9	125.7 $\pm$ 5.6	109.5 $\pm$ 9.5	114.2 $\pm$ 12.1
10.0	97.6 $\pm$ 2.3	125.3 $\pm$ 5.1	90.4 $\pm$ 7.3	128.5 $\pm$ 7.2
30.0	66.6 $\pm$ 9.5	118.2 $\pm$ 8.6	83.3 $\pm$ 2.3	109.5 $\pm$ 0.0

Se incubó el enzima de ovario (0.64 μg de proteína) en presencia de ³H-17 α -hidroxipregnenolona (3 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.3-30 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 15 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 18

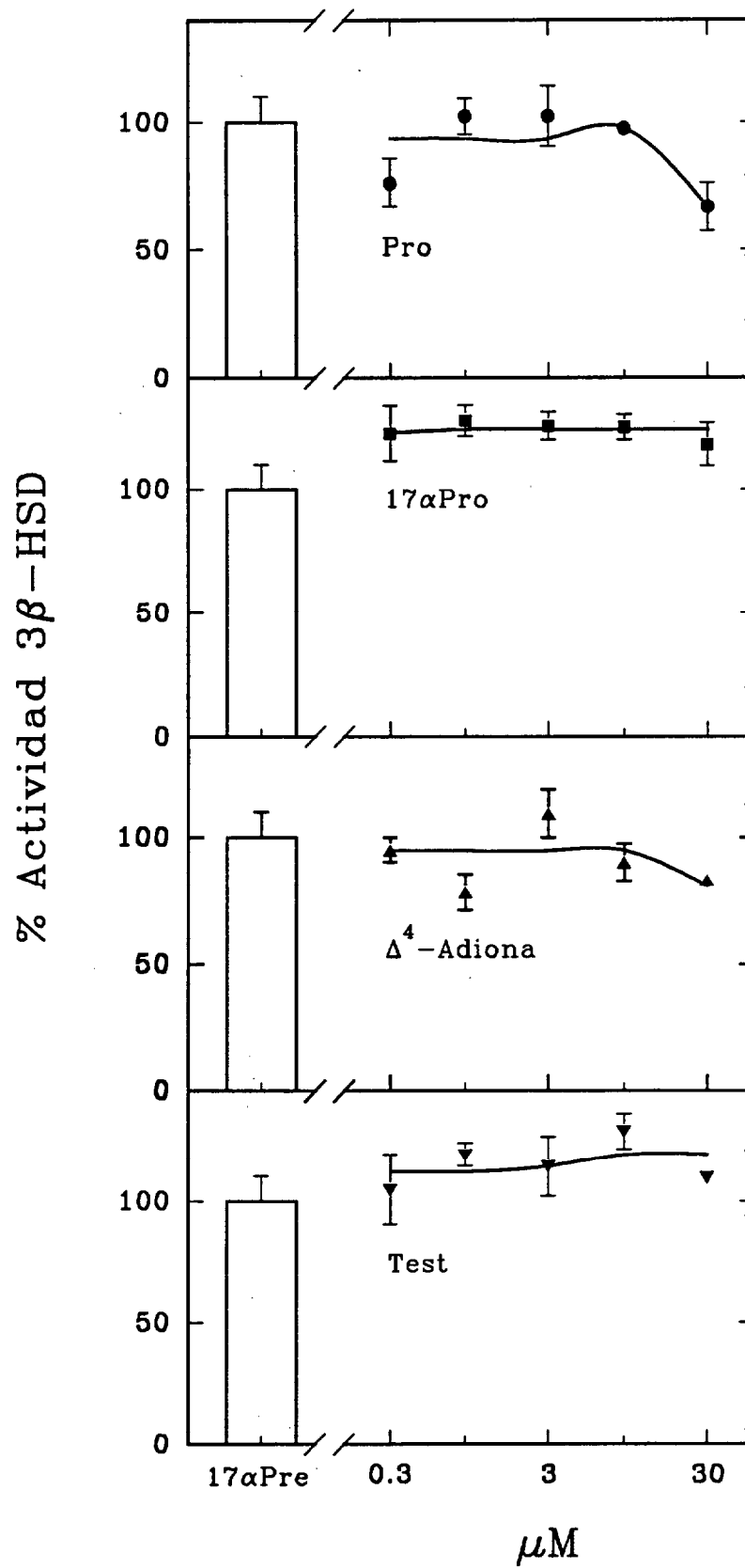


Tabla XIX

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD TESTICULAR DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON DEHIDROEPIANDROSTERONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
0.1	92.3 $\pm$ 0.0	86.5 $\pm$ 1.9	92.3 $\pm$ 11.5	94.2 $\pm$ 1.9
0.3	100.0 $\pm$ 0.0	90.4 $\pm$ 5.8	86.5 $\pm$ 5.8	90.4 $\pm$ 5.8
1.0	94.2 $\pm$ 3.8	92.3 $\pm$ 3.9	86.5 $\pm$ 1.9	96.2 $\pm$ 3.9
3.0	92.3 $\pm$ 0.0	92.3 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 7.7	92.3 $\pm$ 7.7
10.0	78.8 $\pm$ 7.3	82.7 $\pm$ 13.8	86.5 $\pm$ 1.9	82.7 $\pm$ 1.9

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) en presencia de ³H-dehidroepiandrosterona (1 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 2 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 19

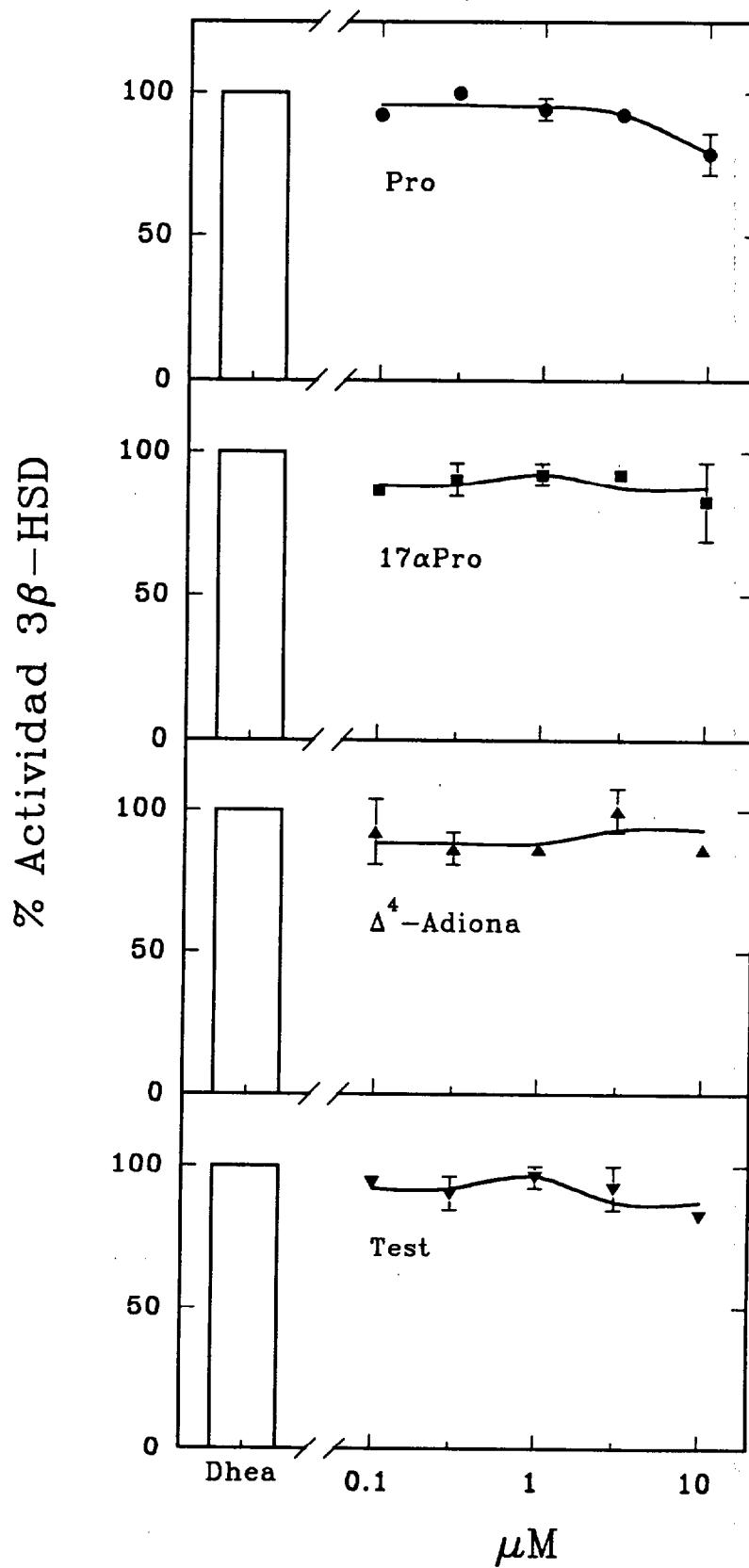


Tabla XX

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD OVÁRICA DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON DEHIDROEPIANDROSTERONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
0.1	95.3 $\pm$ 2.1	87.0 $\pm$ 0.0	86.0 $\pm$ 5.2	95.3 $\pm$ 8.3
0.3	87.0 $\pm$ 2.1	81.9 $\pm$ 3.1	90.2 $\pm$ 3.1	87.0 $\pm$ 8.3
1.0	98.4 $\pm$ 5.2	76.7 $\pm$ 4.1	81.9 $\pm$ 5.2	91.2 $\pm$ 10
3.0	87.0 $\pm$ 2.1	79.8 $\pm$ 1.0	94.3 $\pm$ 5.2	80.8 $\pm$ 0.0
10.0	75.6 $\pm$ 3.1	75.6 $\pm$ 9.5	81.9 $\pm$ 3.1	87.0 $\pm$ 2.1

Se incubó el enzima de ovario (0.64 μg de proteína) en presencia de ³H-dehidroepiandrosterona (1 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 2 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 20

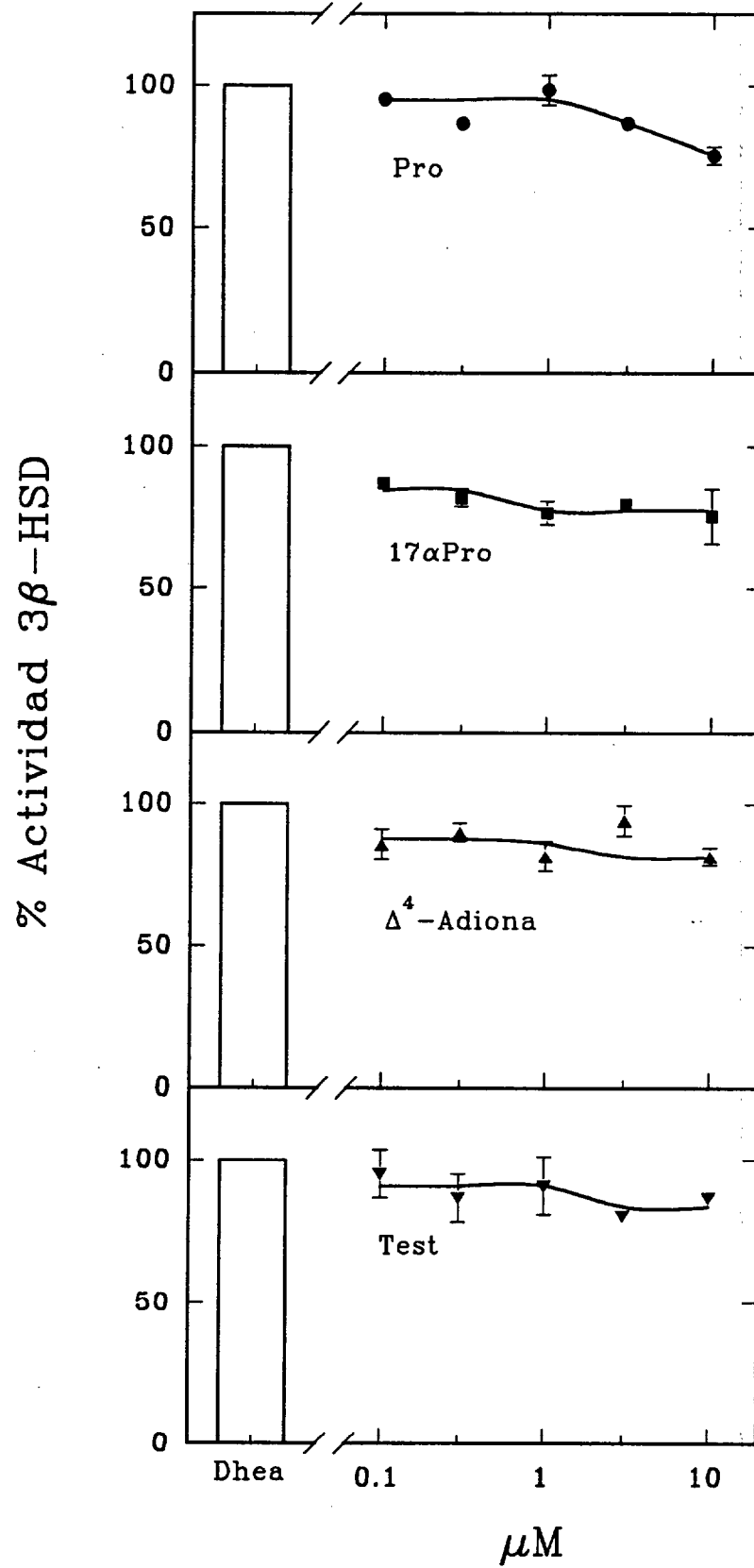


Tabla XXI

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD TESTICULAR DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON ANDROSTENDIOL COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 6.5	100.0 $\pm$ 6.5	100.0 $\pm$ 6.5	100.0 $\pm$ 6.5
0.1	112.0 $\pm$ 2.0	110.0 $\pm$ 0.0	101.0 $\pm$ 3.0	102.0 $\pm$ 4.0
0.3	115.0 $\pm$ 3.0	116.0 $\pm$ 4.0	102.0 $\pm$ 10.0	106.0 $\pm$ 7.0
1.0	118.0 $\pm$ 2.0	102.0 $\pm$ 4.0	114.0 $\pm$ 4.0	101.0 $\pm$ 3.0
3.0	102.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 4.0	97.0 $\pm$ 1.0	95.0 $\pm$ 1.0
10.0	99.0 $\pm$ 1.0	115.0 $\pm$ 1.0	92.0 $\pm$ 2.0	97.0 $\pm$ 5.0

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) en presencia de ^3H -androstendiol (1 μM), NAD $^+$ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 3 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 21

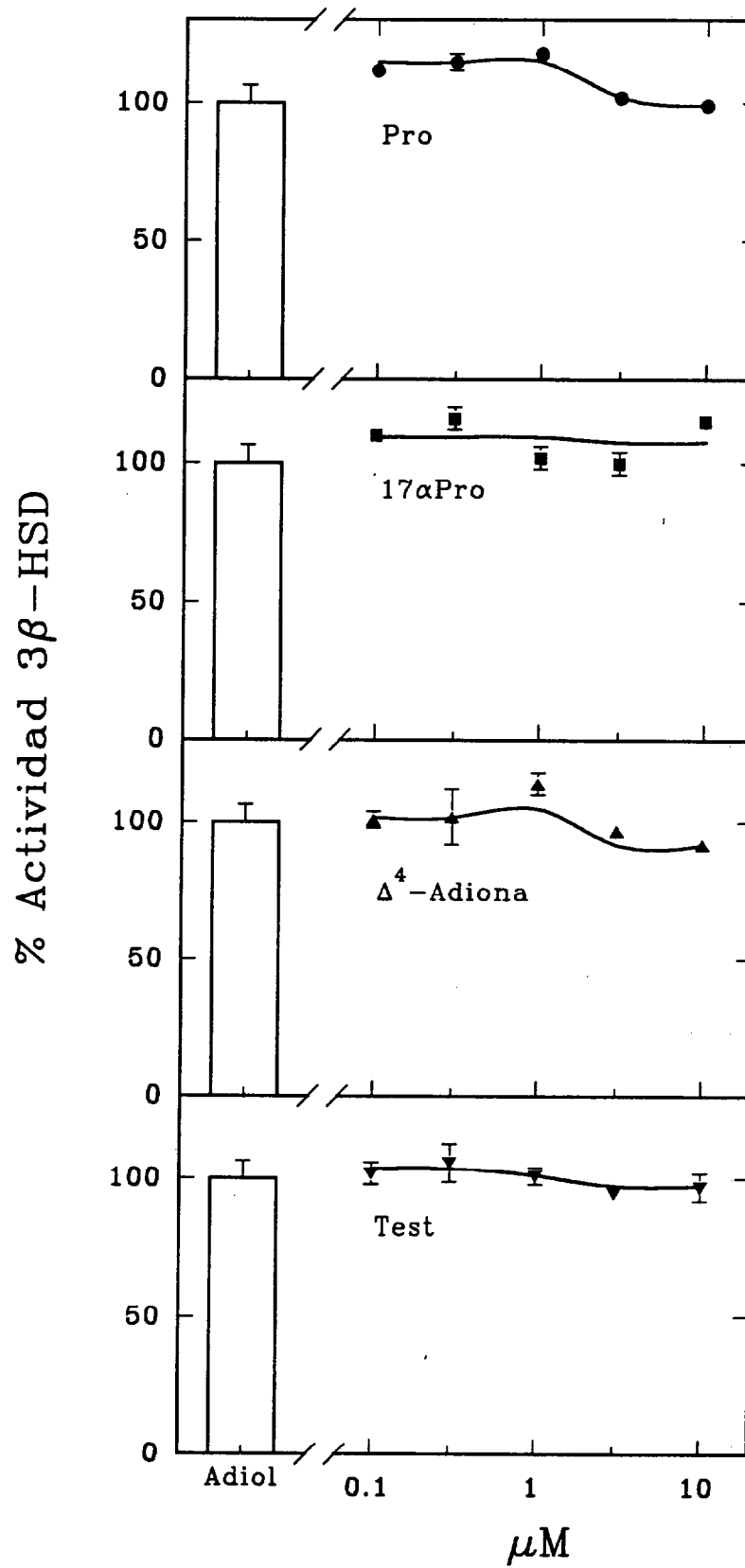


Tabla XXII

EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3 β -HSD OVÁRICA DE LOS DISTINTOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN CON ANDROSTENDIOL COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD			
	Pro	17 α Pro	Δ^4 -Adiona	Test
0.0	100.0 $\pm$ 1.3	100.0 $\pm$ 1.3	100.0 $\pm$ 1.3	100.0 $\pm$ 1.3
0.1	93.4 $\pm$ 4.9	97.3 $\pm$ 14.1	95.1 $\pm$ 3.1	97.8 $\pm$ 4.0
0.3	92.0 $\pm$ 0.0	96.5 $\pm$ 3.5	103.5 $\pm$ 7.1	97.3 $\pm$ 2.7
1.0	95.5 $\pm$ 3.5	106.2 $\pm$ 0.0	101.8 $\pm$ 0.9	93.4 $\pm$ 0.5
3.0	92.5 $\pm$ 2.2	102.7 $\pm$ 7.1	88.5 $\pm$ 2.7	96.9 $\pm$ 3.1
10.0	81.9 $\pm$ 0.5	90.7 $\pm$ 3.1	81.0 $\pm$ 2.2	87.6 $\pm$ 2.7

Se incubó el enzima de ovario (0.64 μg de proteína) en presencia de ³H-androstendiol (1 μM), NAD⁺ (0.6 mM) y concentraciones crecientes (0.1-10 μM) de los distintos productos de la reacción (Pro, 17 α Pro, Δ^4 -Adiona o Test). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0.1 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) a 37 °C durante 3 minutos. Los resultados (media $\pm$ SEM) se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad en presencia de producto de reacción dividido por la actividad en ausencia, y multiplicado por 100).

Figura 22

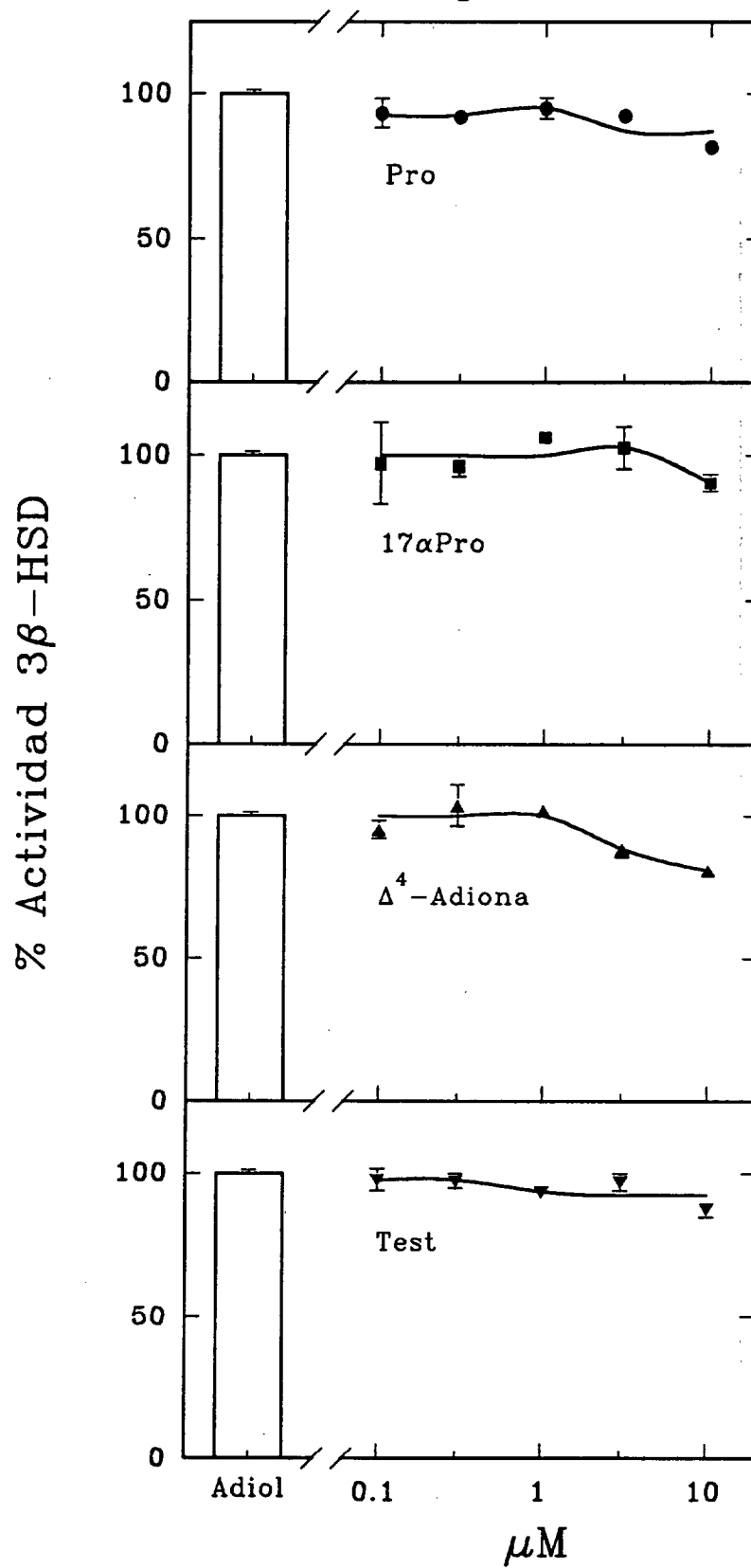


Tabla XXIIIa

EFFECTO DE DIVERSOS ESTEROIDES NATURALES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE TESTÍCULO

	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Dhea
Control	100.0 $\pm$ 5.4	100.0 $\pm$ 4.6	100.0 $\pm$ 5.4
DH	80.3 $\pm$ 5.3	100.5 $\pm$ 5.8	100.0 $\pm$ 0.4
α -Diol	85.5 $\pm$ 1.1	87.0 $\pm$ 4.3	83.4 $\pm$ 3.5
β -Diol	69.9 $\pm$ 0.7	74.5 $\pm$ 9.6	77.1 $\pm$ 1.5
E ₁	59.3 $\pm$ 0.5	38.5 $\pm$ 5.9	79.1 $\pm$ 2.1
E ₂	62.4 $\pm$ 0.1	38.4 $\pm$ 1.1	73.8 $\pm$ 0.5
Ck	4.6 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.7

Se determinó la actividad del enzima de testículo (1.22 μ g de proteína) en presencia de cantidades equimolares (1 μ M) de los sustratos (Pre, 17 α Pre, Dhea) y esteroides usados como inhibidores (DHT: dihidrotestosterona, α -Diol: 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, β -Diol: 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, E₁: estrona, E₂: estradiol, Ck: cianoketona). La reacción se realizó a 37 °C durante 2 min. El resto de las condiciones experimentales se detallan en Material y Métodos. A efectos comparativos se incluye el efecto de 1 μ M de cianoketona, un potente inhibidor del enzima.

Tabla XXIIIb

EFFECTO DE DISTINTOS ESTEROIDES NATURALES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA DE OVARIO

	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Dhea
Control	100.0 $\pm$ 7.5	100.0 $\pm$ 7.5	100.0 $\pm$ 1.0
DHT	99.6 $\pm$ 0.4	86.7 $\pm$ 0.5	95.5 $\pm$ 4.3
α -Diol	87.7 $\pm$ 19.1	79.2 $\pm$ 1.0	94.2 $\pm$ 6.2
β -Diol	87.7 $\pm$ 10.7	76.5 $\pm$ 7.6	75.4 $\pm$ 4.4
E ₁	70.7 $\pm$ 4.1	27.3 $\pm$ 1.0	64.9 $\pm$ 15.1
E ₂	89.1 $\pm$ 0.9	46.6 $\pm$ 6.5	88.6 $\pm$ 2.8
Ck	1.6 $\pm$ 0.21	4.4 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.7

Se determinó la actividad del enzima de ovario (0.24 μ g de proteína) en presencia de cantidades equimolares (1 μ M) de los sustratos (Pre, 17 α Pre, Dhea) y esteroides usados como inhibidores (DHT: dihidrotestosterona, α -Diol: 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, β -Diol: 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol, E₁: estrona, E₂: estradiol, Ck: cianoketona). La reacción se realizó a 37 °C durante 2 min. El resto de las condiciones experimentales se detallan en Material y Métodos. A efectos comparativos se incluye el efecto de 1 μ M de cianoketona, un potente inhibidor del enzima.

Figura 23

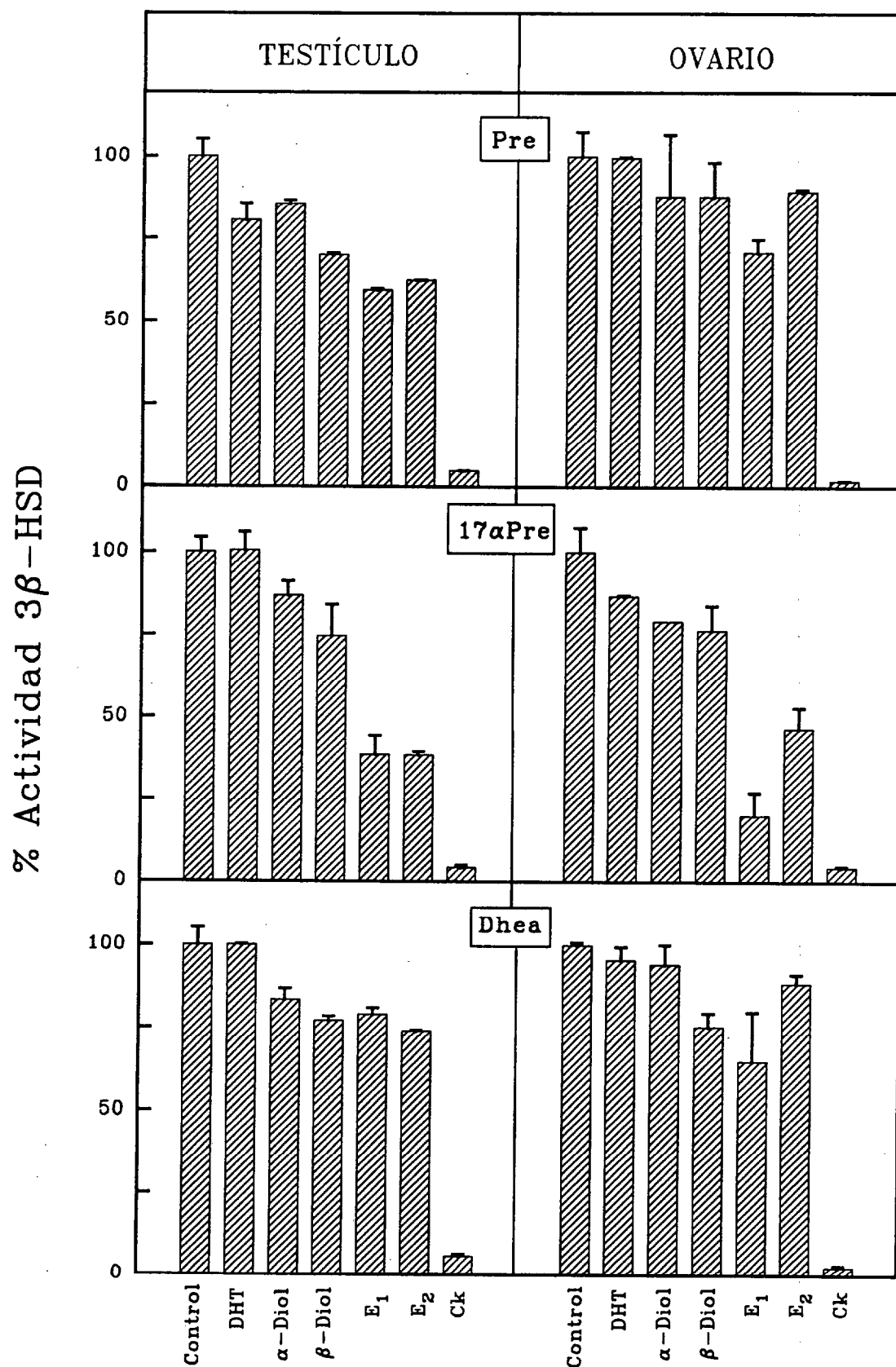


Tabla XXIV

EFEECTO DE LOS ESTEROIDES 17 α PRE, DHEA Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE TESTÍCULO UTILIZANDO PREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	17 α Pre	Dhea	Adiol
0.0	100.0 $\pm$ 12.6	100.0 $\pm$ 8.3	100.0 $\pm$ 5.4
0.1	136.5 $\pm$ 7.0	97.3 $\pm$ 4.7	76.2 $\pm$ 6.5
0.3	124.9 $\pm$ 4.1	73.2 $\pm$ 1.8	102.7 $\pm$ 7.6
1.0	111.8 $\pm$ 5.3	48.6 $\pm$ 0.6	76.8 $\pm$ 5.4
3.0	80.0 $\pm$ 4.1	24.0 $\pm$ 6.5	70.8 $\pm$ 6.5
10.0	50.0 $\pm$ 2.6	10.0 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 4.3

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) con ³H-pregnenolona (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (17 α Pre, Dhea o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 2 minutos a 37 °C . Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-progesterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de 17 α Pre, Dhea o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 24

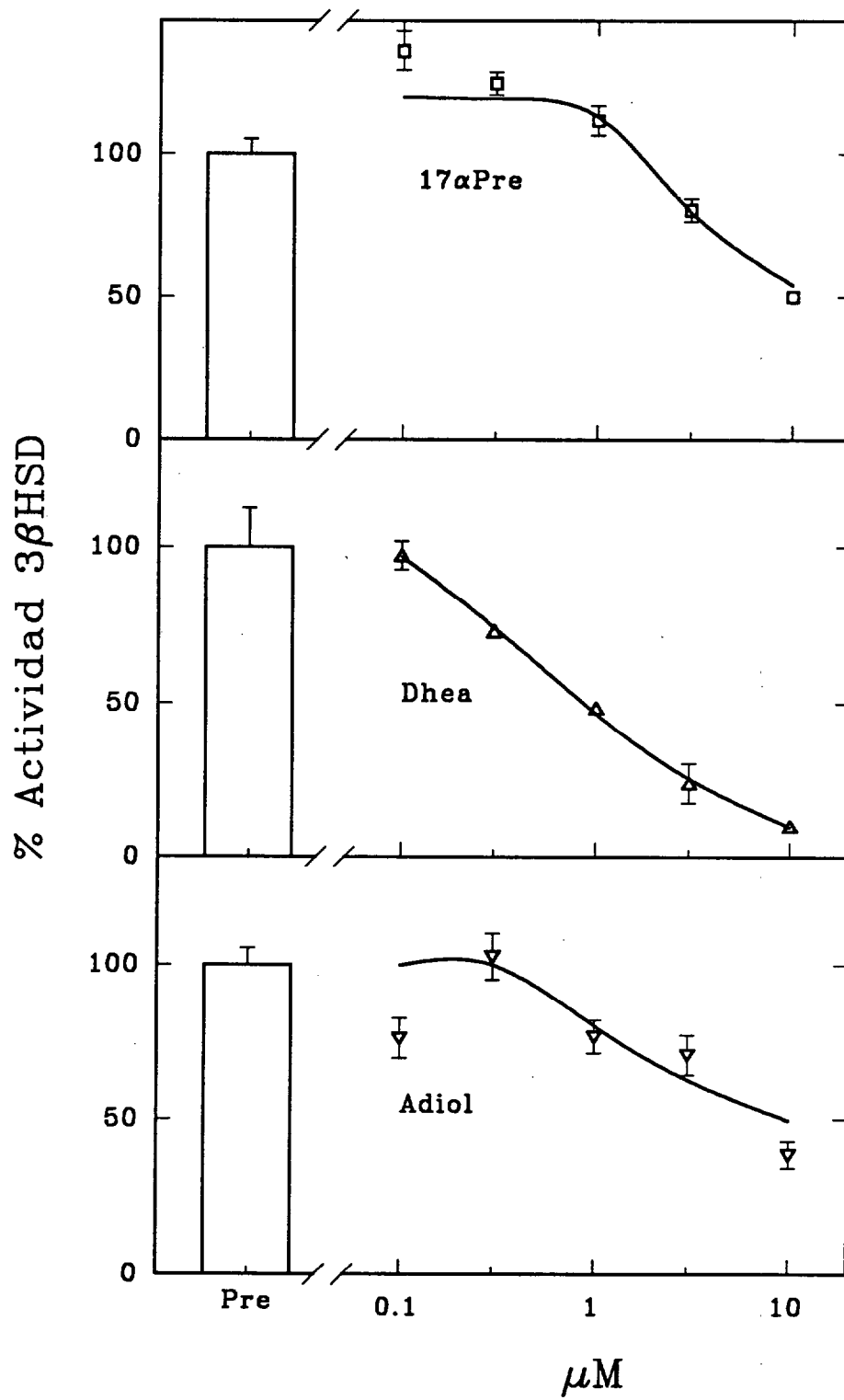


Tabla XXV

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES 17 α PRE, DHEA Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE OVARIO UTILIZANDO PREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	17 α Pre	Dhea	Adiol
0.0	100.0 $\pm$ 10.7	100.0 $\pm$ 10.7	100.0 $\pm$ 3.4
0.1	99.2 $\pm$ 11.5	115.6 $\pm$ 1.1	117.4 $\pm$ 5.8
0.3	90.7 $\pm$ 12.8	85.2 $\pm$ 0.0	113.4 $\pm$ 5.4
1.0	91.4 $\pm$ 8.2	65.1 $\pm$ 5.2	107.1 $\pm$ 3.2
3.0	107.1 $\pm$ 4.9	36.4 $\pm$ 4.2	63.9 $\pm$ 4.7
10.0	40.0 $\pm$ 5.2	10.2 $\pm$ 1.0	42.0 $\pm$ 3.0

Se incubó el enzima de ovario (0.24 μg de proteína) con ³H-pregnenolona (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (17 α Pre, Dhea o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 2 minutos a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-progesterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de 17 α Pre, Dhea o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 25

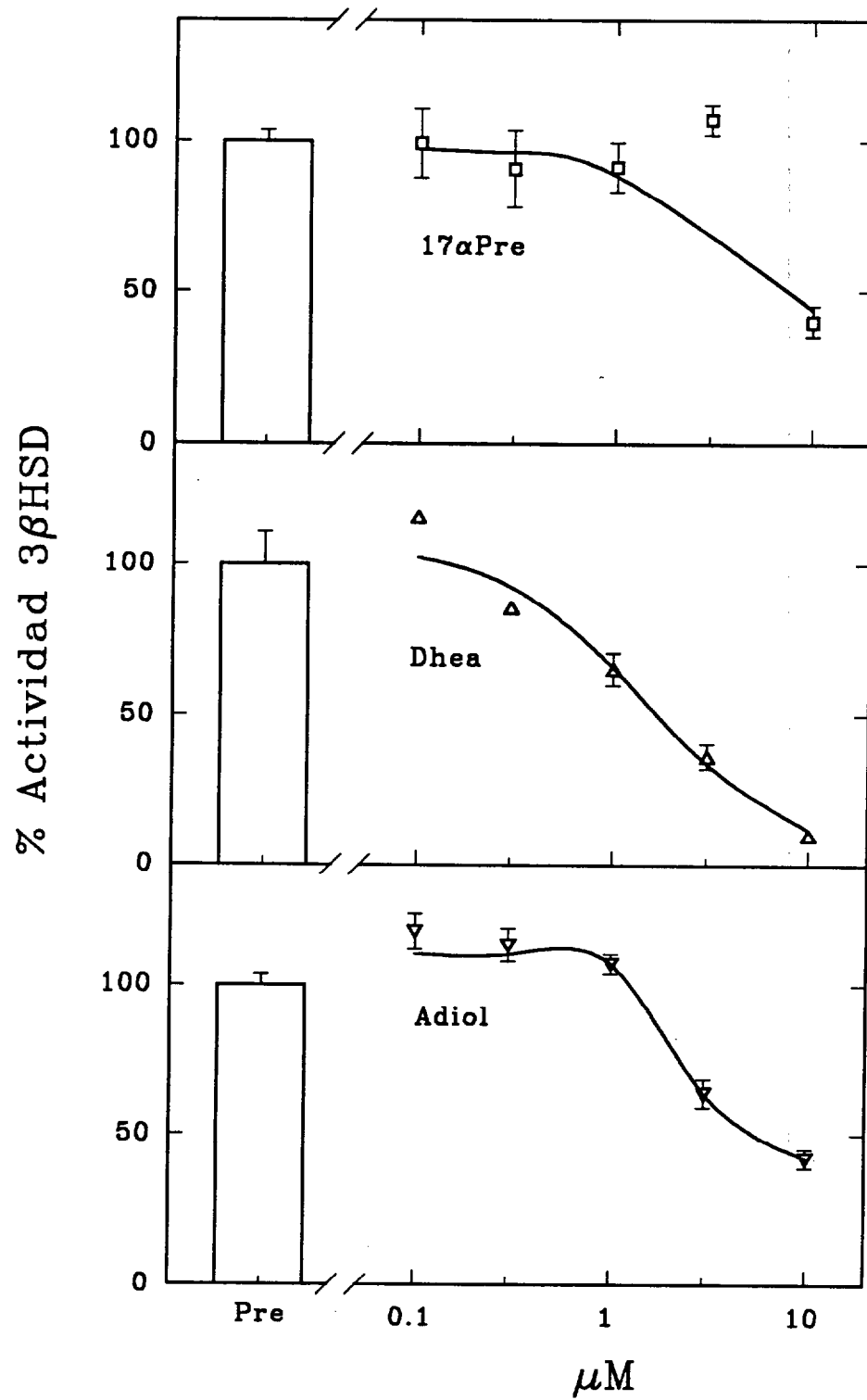


Tabla XXVI

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, DHEA Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE TESTÍCULO UTILIZANDO 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	Dhea	Adiol
0.0	100.0±10.7	100.0±10.7	100.0±2.9
0.1	91.3±7.2	76.9±1.4	86.5±2.5
0.3	71.1±0.0	58.6±0.5	71.7±2.9
1.0	40.3±0.5	26.9±0.0	52.6±3.9
3.0	21.1±0.5	19.2±3.3	26.0±1.2
10.0	12.5±0.5	10.5±1.0	17.0±1.2

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) con ³H-17 α -hidroxipregnenolona (3 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, Dhea o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-17 α -hidroxiprogesterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de Pre, Dhea o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 26

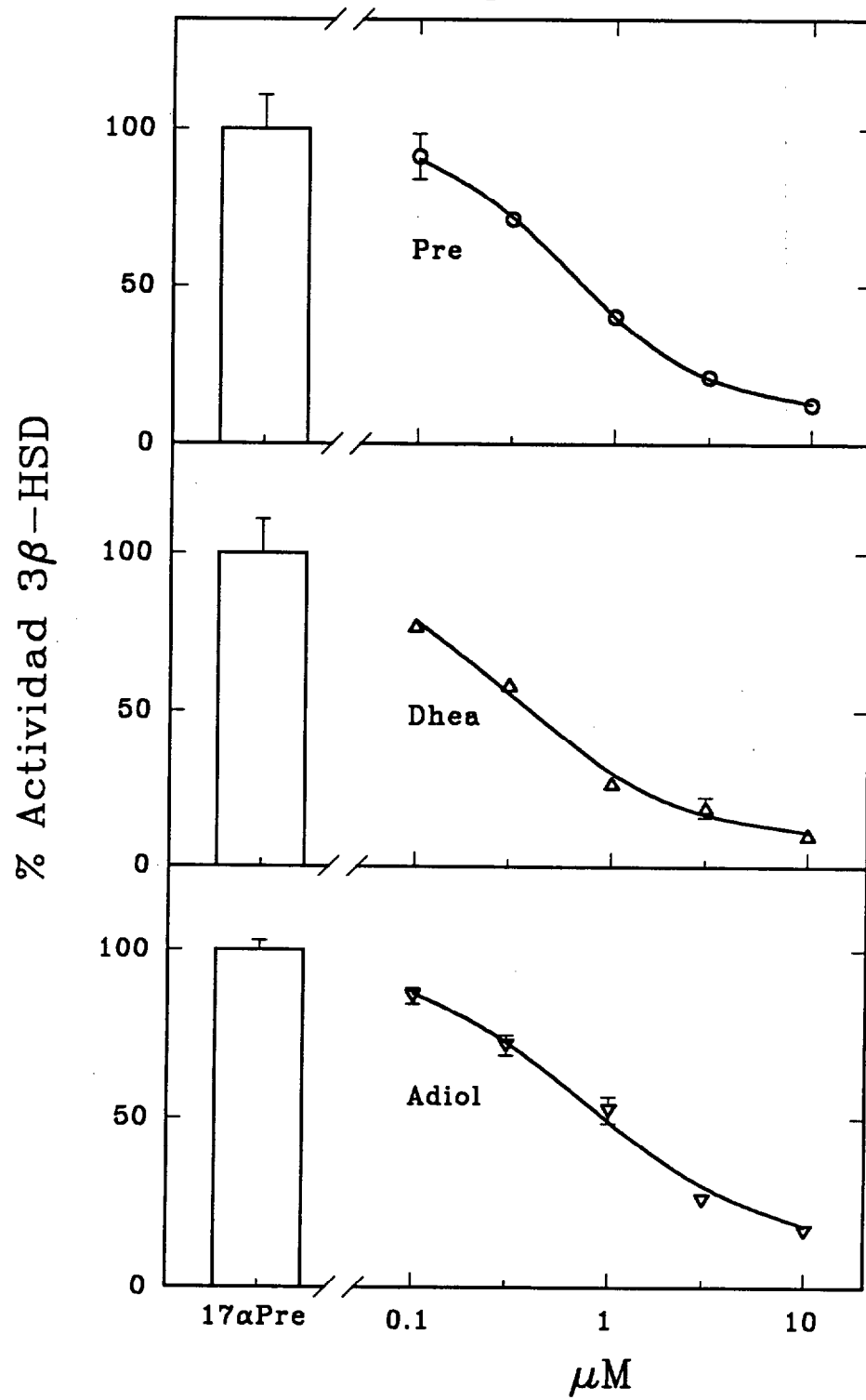


Tabla XXVII

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, DHEA Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE OVARIO UTILIZANDO 17 α -HIDROXIPREGNENOLONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	Dhea	Adiol
0.0	100.0±11.7	100.0±11.7	100.0±5.6
0.1	95.3±7.1	89.0±8.7	96.5±2.8
0.3	95.3±20.3	78.1±5.4	104.9±3.5
1.0	51.5±0.8	46.8±0.8	78.5±1.4
3.0	37.5±3.1	26.5±1.6	46.7±2.3
10.0	20.3±3.1	25.0±0.0	26.9±2.6

Se incubó el enzima de ovario (0.24 μg de proteína) con ³H-17 α -hidroxipregnenolona (3 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, Dhea o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 8 minutos a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-17 α -hidroxiprogesterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de 17 α Pre, Dhea o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 27

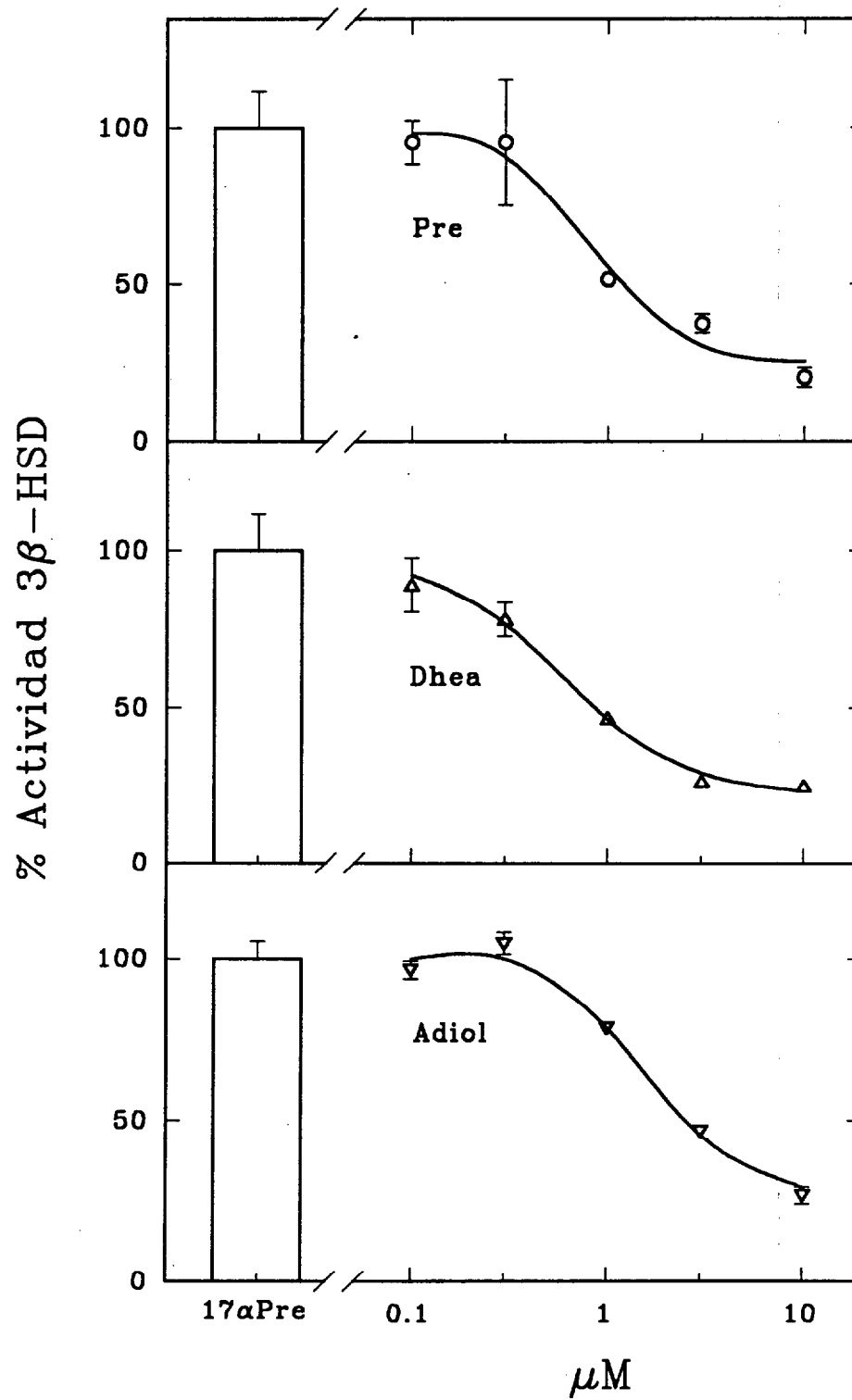


Tabla XXVIII

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, 17 α PRE Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE TESTÍCULO UTILIZANDO DEHIDROEPIANDROSTERONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Adiol
0.0	100.0 $\pm$ 8.9	100.0 $\pm$ 8.9	100.0 $\pm$ 9.7
0.1	127.4 $\pm$ 2.0	120.0 $\pm$ 13.8	111.4 $\pm$ 7.3
0.3	119.5 $\pm$ 1.0	116.6 $\pm$ 5.9	97.6 $\pm$ 4.5
1.0	97.4 $\pm$ 1.0	111.1 $\pm$ 12.9	101.4 $\pm$ 15.0
3.0	61.5 $\pm$ 7.9	97.9 $\pm$ 11.9	69.2 $\pm$ 4.7
10.0	36.9 $\pm$ 1.9	84.1 $\pm$ 5.9	54.8 $\pm$ 2.7

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) con ³H-dehidroepiandrosterona (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, 17 α Pre o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 1 minuto a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-androstendiona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de Pre, 17 α Pre o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 28

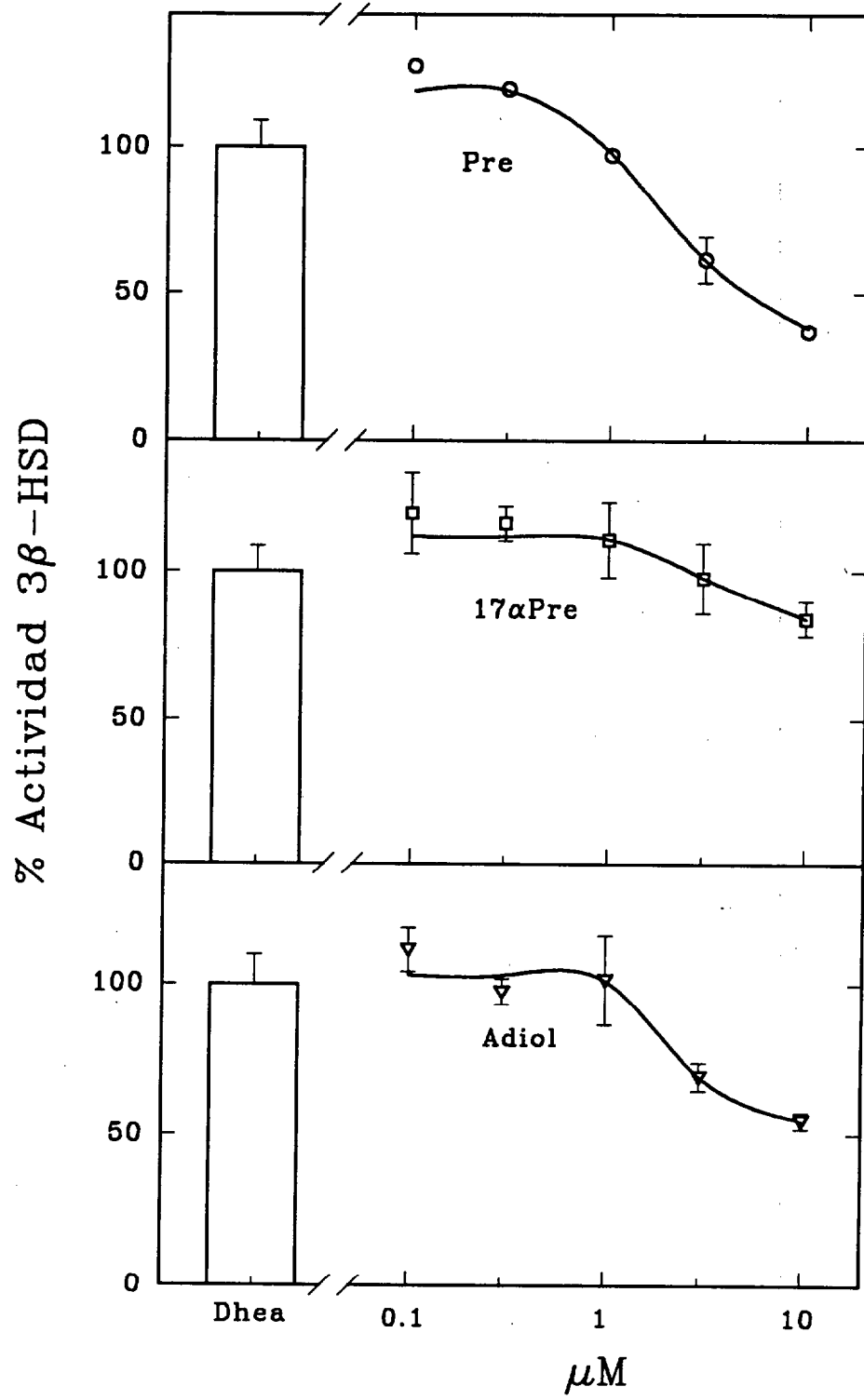


Tabla XXIX

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, 17 α PRE Y ADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE OVARIO UTILIZANDO DEHIDROEPIANDROSTERONA COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Adiol
0.0	100.0 $\pm$ 11	100.0 $\pm$ 3.3	100.0 $\pm$ 2.9
0.1	113.2 $\pm$ 0.7	134.3 $\pm$ 9.7	105.1 $\pm$ 7.2
0.3	100.1 $\pm$ 0.4	133.7 $\pm$ 6.5	93.8 $\pm$ 3.7
1.0	76.4 $\pm$ 2.8	108.3 $\pm$ 4.3	86.0 $\pm$ 6.0
3.0	47.3 $\pm$ 6.7	104.0 $\pm$ 4.3	56.3 $\pm$ 21.8
10.0	32.1 $\pm$ 0	99.4 $\pm$ 14.7	52.3 $\pm$ 2.8

Se incubó el enzima de ovario (0.24 μg de proteína) con ³H-dehidroepiandrosterona (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, 17 α Pre o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 1 minuto a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-androstendiona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de Pre, 17 α Pre o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 29

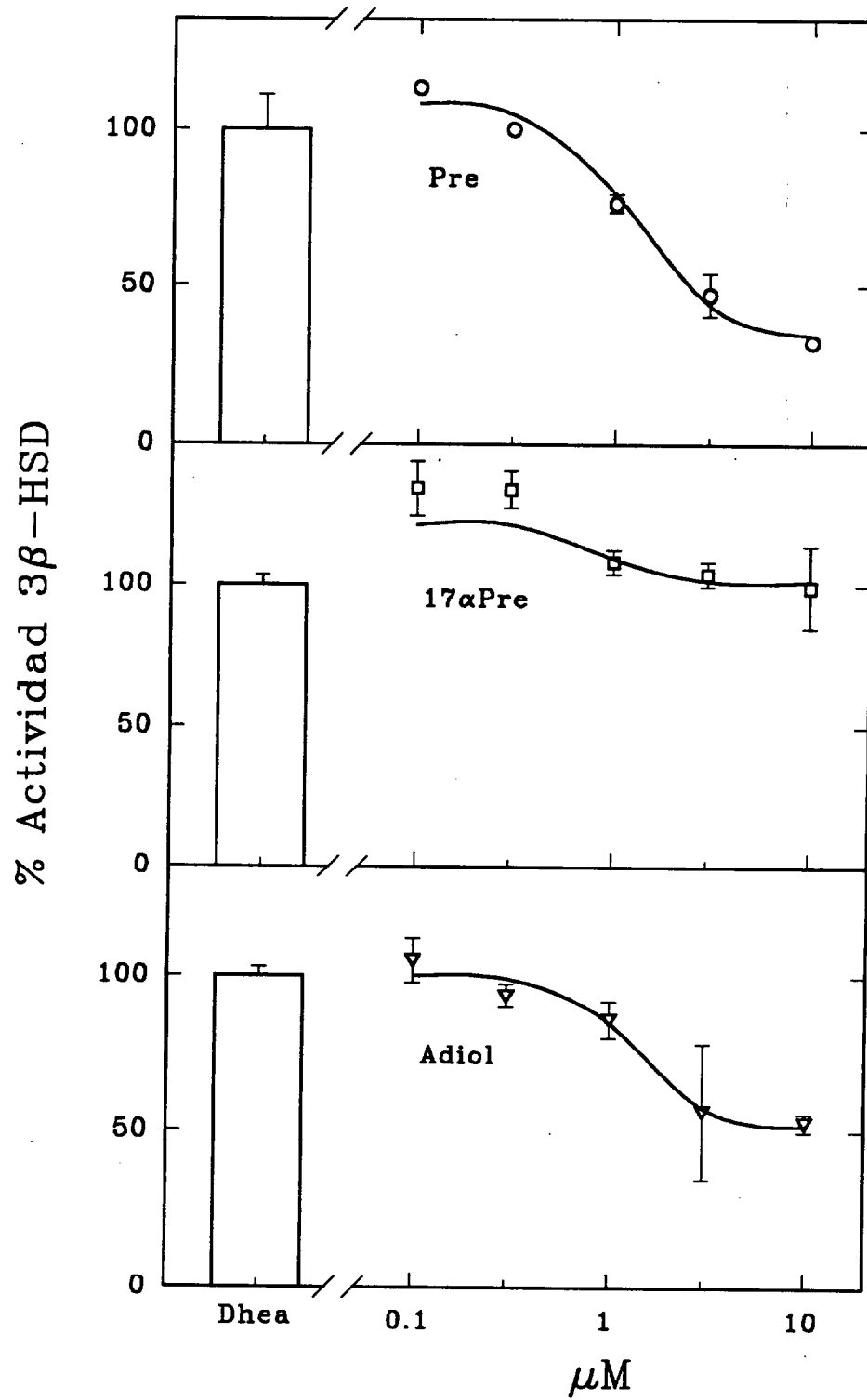


Tabla XXX

EFFECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, 17 α PRE Y DHEA SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE TESTÍCULO UTILIZANDO ANDROSTENDIOL COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Dhea
0.0	100.0 $\pm$ 10.4	100.0 $\pm$ 10.4	100.0 $\pm$ 10.4
0.1	91.9 $\pm$ 0.0	106.8 $\pm$ 12.2	82.4 $\pm$ 4.1
0.3	85.1 $\pm$ 1.4	90.5 $\pm$ 4.1	70.3 $\pm$ 5.4
1.0	63.5 $\pm$ 1.4	91.9 $\pm$ 0.0	45.9 $\pm$ 2.7
3.0	33.8 $\pm$ 1.4	77.0 $\pm$ 9.5	23.0 $\pm$ 1.4
10.0	20.3 $\pm$ 1.4	74.3 $\pm$ 6.8	13.5 $\pm$ 0.0

Se incubó el enzima testicular (1.22 μg de proteína) con ³H-androstendiol (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, 17 α Pre o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 2.5 minutos a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-testosterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de Pre, 17 α Pre o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 30

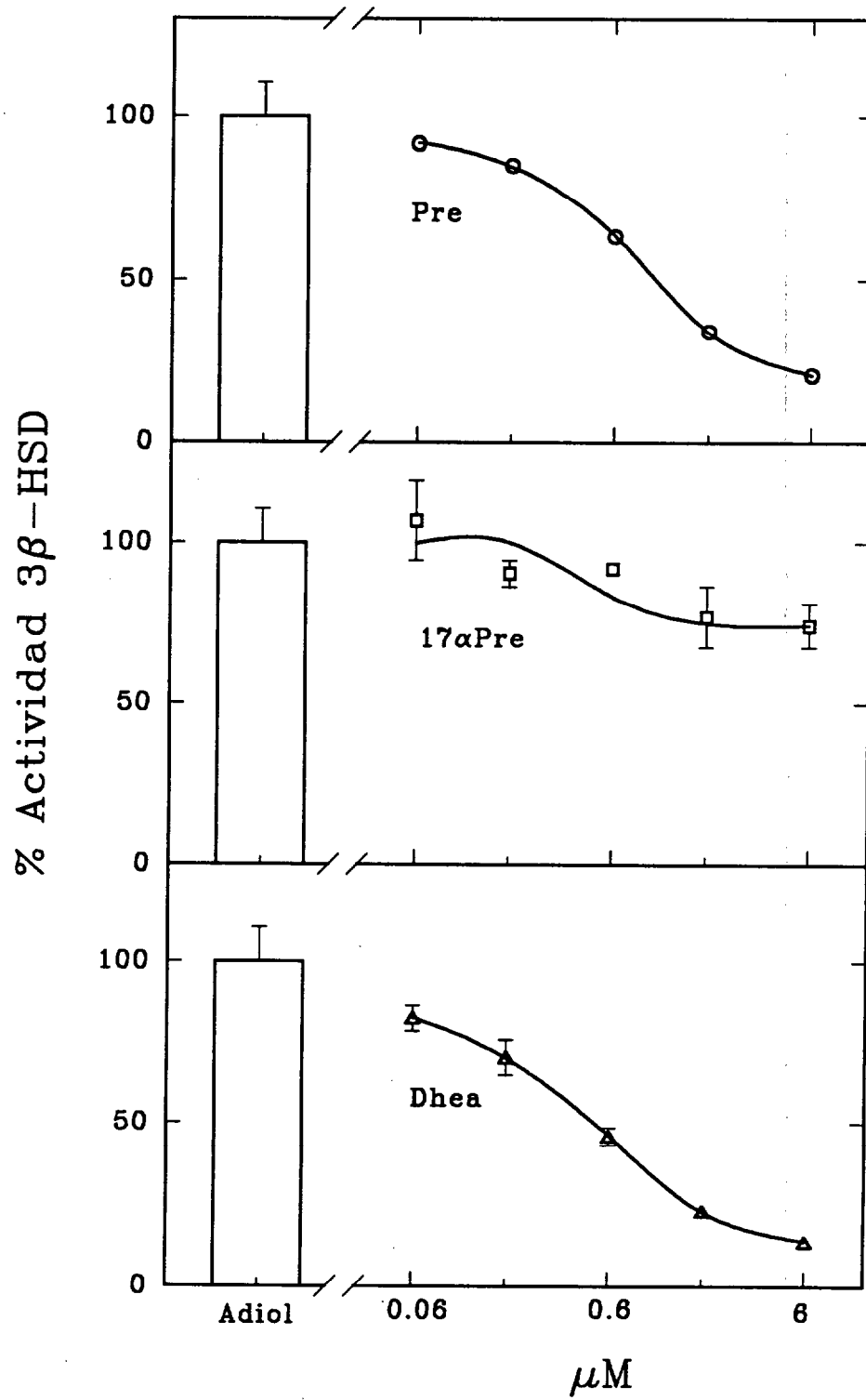


Tabla XXXI

EFEECTO DE LOS ESTEROIDES PRE, 17 α PRE Y DHEA SOBRE LA ACTIVIDAD 3 β -HSD DE OVARIO UTILIZANDO ANDROSTENDIOL COMO SUSTRATO

(μM)	% Actividad 3 β -HSD		
	Pre	17 α Pre	Dhea
0.0	100.0 $\pm$ 10.5	100.0 $\pm$ 10.5	100.0 $\pm$ 10.5
0.1	98.7 $\pm$ 3.9	106.6 $\pm$ 3.9	105.3 $\pm$ 6.6
0.3	90.8 $\pm$ 9.2	107.2 $\pm$ 3.3	98.0 $\pm$ 11.2
1.0	64.5 $\pm$ 7.9	110.5 $\pm$ 1.3	54.6 $\pm$ 0.7
3.0	44.1 $\pm$ 2.0	91.4 $\pm$ 2.0	38.2 $\pm$ 7.9
10.0	25.0 $\pm$ 0.0	72.4 $\pm$ 1.3	17.8 $\pm$ 2.0

Se incubó el enzima de ovario (0.24 μg de proteína) con ³H-androstendiol (1 μM) como sustrato, en presencia de NAD⁺ (0.6 mM). Los restantes sustratos utilizados por el enzima 3 β -HSD (Pre, 17 α Pre o Adiol) se añadieron a distintas concentraciones (0.1-10 μM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 0.1 ml en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción se fijó en 2.5 minutos a 37 °C. Los esteroides se separaron por CCF, y el producto de la reacción, ³H-testosterona, se cuantificó por espectrometría de centelleo. Los resultados se expresaron como % de actividad 3 β -HSD (actividad 3 β -HSD en presencia de Pre, 17 α Pre o Adiol dividido por la actividad total, en ausencia de sustratos competidores, y multiplicado por 100).

Figura 31

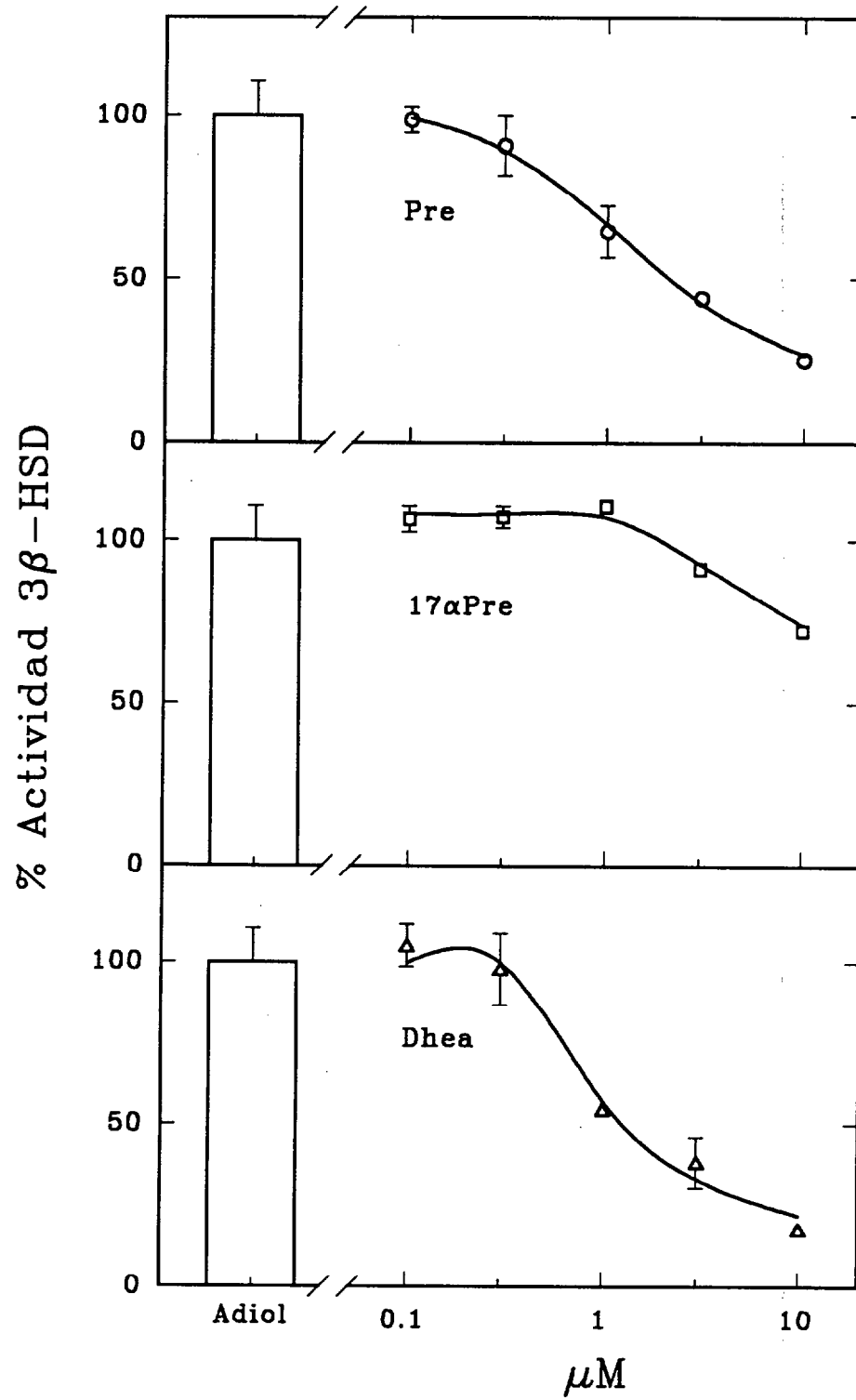


Tabla XXXIIa

**EFFECTO DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD DEL
ENZIMA 3 β -HSD DE TESTÍCULO Y OVARIO**

Sustrato	nmol producto/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
Pregnenolona	1.12 $\pm$ 0.07	6.03 $\pm$ 0.58
17 α -Hidroxipregnenolona	0.50 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.16
Dehidroepiandrosterona	0.75 $\pm$ 0.07	4.41 $\pm$ 0.37
Androstendiol	1.20 $\pm$ 0.07	6.03 $\pm$ 0.24

Se ensayó la actividad del enzima 3 β -HSD con los distintos sustratos (Pre, 17 α Pre, Dhea o Adiol) a la misma concentración (8 μ M) usando 1.22 ó 0.24 μ g de proteína de testículo y ovario respectivamente. El resto de las condiciones de ensayo fueron idénticas a las descritas en Material y Métodos, salvo la concentración de NAD⁺ (1.2 mM) y el tiempo de reacción que se fijó en 8 minutos.

Tabla XXXIIb

TRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS POR EL ENZIMA 3 β -HSD EN UNA MEZCLA CONTENIENDO LOS CUATRO ESTEROIDES A CONCENTRACIONES EQUIVALENTES A SUS RESPECTIVAS K_M

Sustrato	nmol producto/min/mg prot	
	Testículo	Ovario
Pregnenolona	0.11 $\pm$ 0.00	1.40 $\pm$ 0.03
17 α -Hidroxipregnenolona	0.26 $\pm$ 0.00	0.79 $\pm$ 0.11
Dehidroepiandrosterona	0.28 $\pm$ 0.03	1.37 $\pm$ 0.07
Androstendiol	0.43 $\pm$ 0.04	6.00 $\pm$ 0.37

La mezcla de reacción (1.22 ó 0.24 μ g de proteína para testículo y ovario, respectivamente) y los cuatro esteroides utilizados como sustrato por el enzima en concentraciones (μ M) equivalentes a sus respectivas K_M (Pre, T:0.20 $\pm$ 0.01; Ov:0.26 $\pm$ 0.01. 17 α Pre, T:3.52 $\pm$ 0.03; Ov:2.21 $\pm$ 0.09. Dhea, T:0.26 $\pm$ 0.02; Ov:0.13 $\pm$ 0.01. Adiol, T:0.65 $\pm$ 0.02; Ov:1.07 $\pm$ 0.04), de los cuales sólo el calificado como sustrato estaba marcado radiactivamente. El resto de las condiciones fue el descrito en Material y Métodos salvo el tiempo de incubación que se fijó en 6 minutos.

Tabla XXXIIc

**TRANSFORMACIÓN DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS POR EL ENZIMA 3 β -HSD
EN UNA MEZCLA CON LOS CUATRO ESTEROIDES A CONCENTRACIONES
SATURANTES**

<i>Sustrato</i>	<i>(nmol producto/min/mg prot) x 10³</i>	
	<i>Testículo</i>	<i>Ovario</i>
<i>Pregnenolona</i>	13.1 $\pm$ 4.0	63.3 $\pm$ 7.2
<i>17α-Hidroxipregnenolona</i>	15.2 $\pm$ 11.7	11.9 $\pm$ 7.9
<i>Dehidroepiandrosterona</i>	371.0 $\pm$ 21.0	340.0 $\pm$ 17.0
<i>Androstendiol</i>	248.0 $\pm$ 6.0	196.0 $\pm$ 14.0

La mezcla de reacción estuvo constituida por 1.22 μ g y 0.24 μ g de proteína de testículo y ovario, respectivamente, y 8 μ M de cada sustrato (Pre, 17 α Pre, Dhea, Adiol). El resto de las condiciones de ensayo fueron las descritas en Material y Métodos, excepto la concentración de NAD⁺ (1.2 mM) y el tiempo de reacción (8 min).

Figura 32

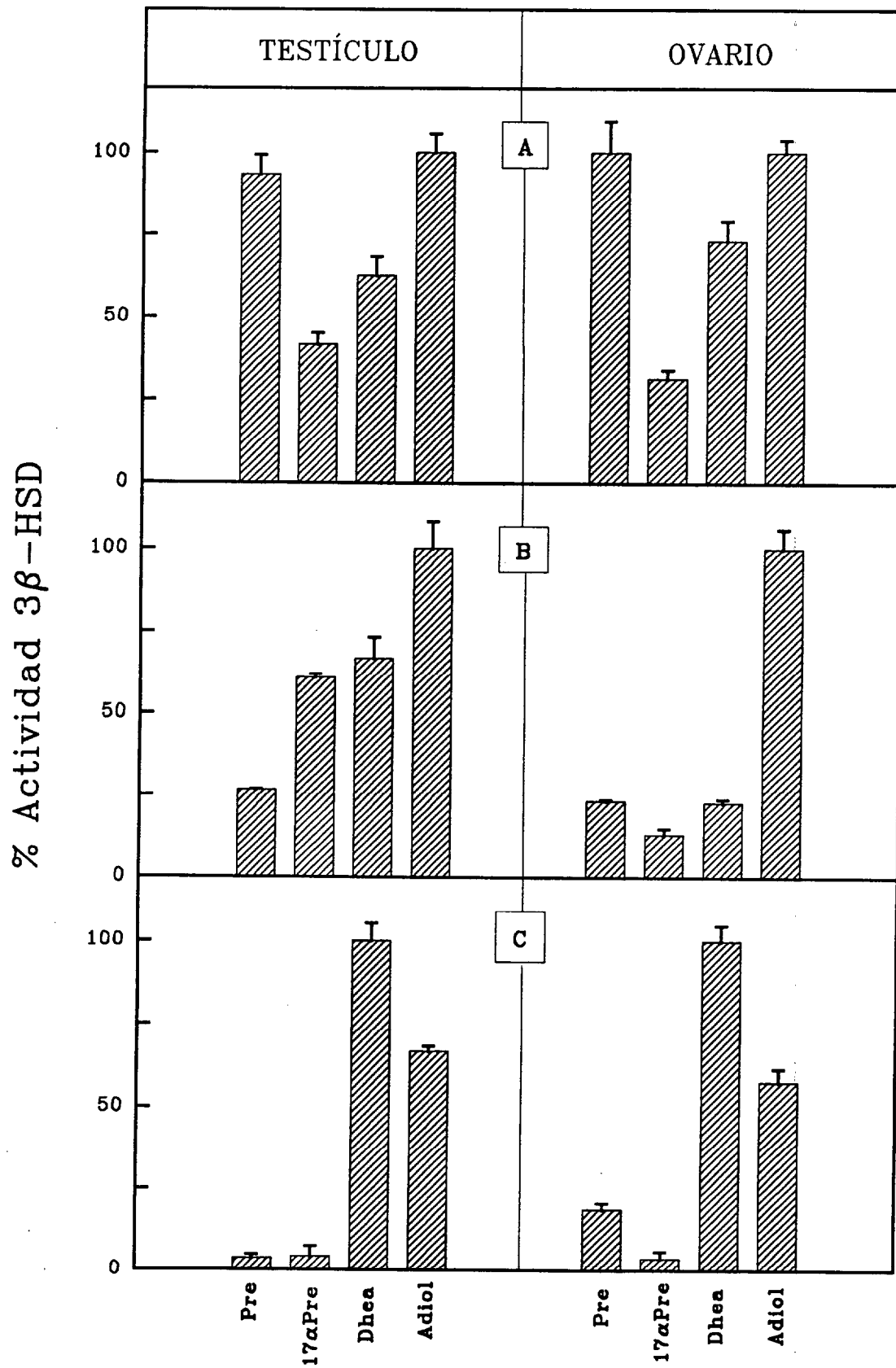


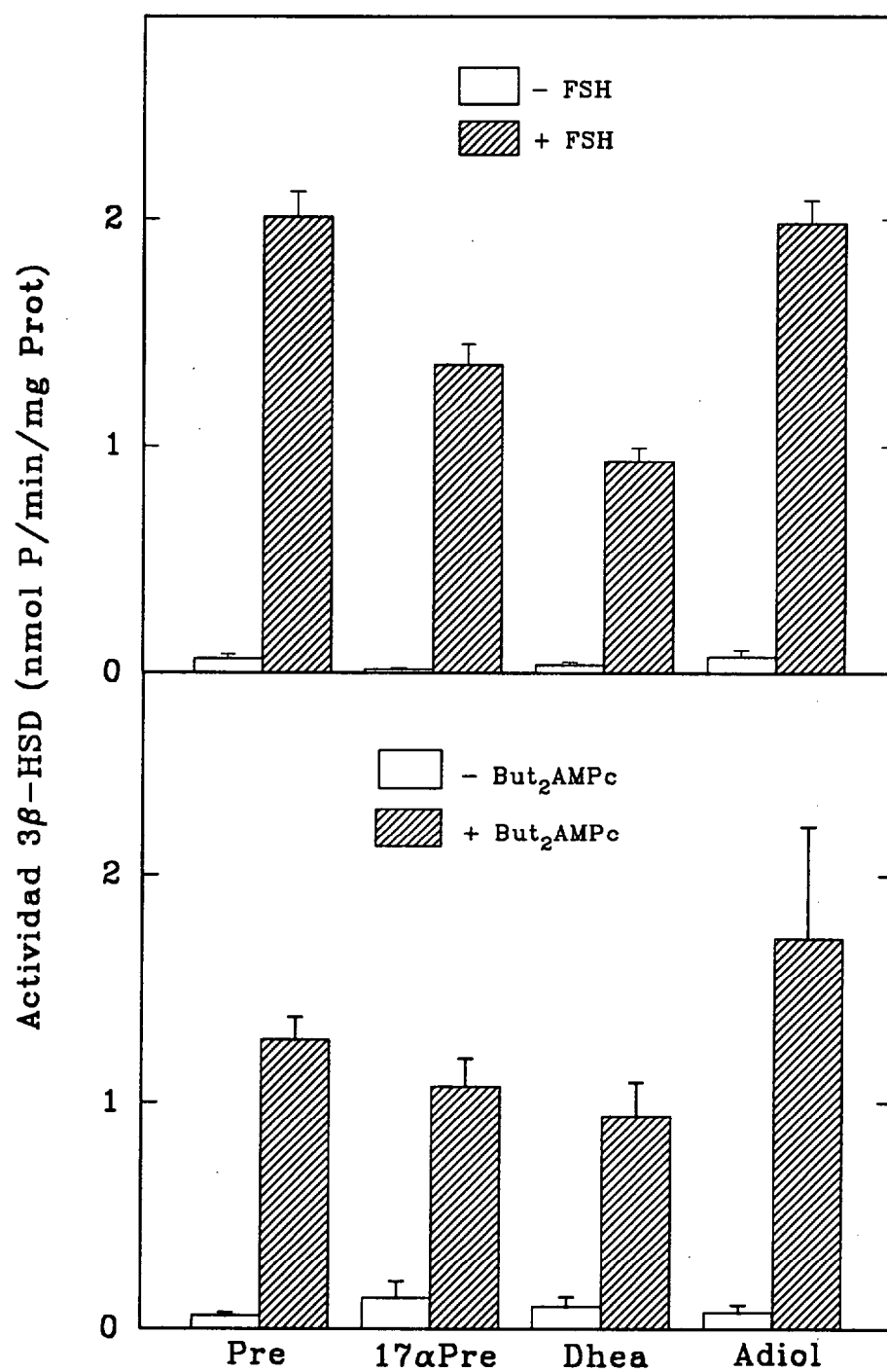
Tabla XXXIII

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON FSH Y BUT₂AMPC SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3 β -HSD EN CÉLULAS GRANULOSA MANTENIDAS EN CULTIVO PRIMARIO

Tratamiento	nmol producto/min/mg prot			
	Pre	17 α Pre	Dhea	Adiol
- FSH	0.06 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03
+ FSH	2.01 $\pm$ 0.11	1.36 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.06	1.98 $\pm$ 0.10
- But ₂ AMPC	0.06 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.08	0.09 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.03
+ But ₂ AMPC	1.27 $\pm$ 0.10	1.07 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.15	1.72 $\pm$ 0.50

Se mantuvieron células granulosa en cultivo primario durante 72 horas en presencia o ausencia de FSH (200 ng/ml) o But₂AMPC (1 mM). Al final de este periodo las células se despegaron y sonicaron en tampón 50 mM fosfato potásico, 1mM EDTA (pH 7.4), tal y como se detalla en Material Y Métodos. La actividad 3 β -HSD se determinó con cada uno de los sustratos (50 μ M) en presencia de NAD⁺ (0.6 mM), durante 5 min a 37 °C.

Figura 33



V

DISCUSIÓN

La introducción de técnicas de Biología Molecular en el estudio del metabolismo ha repercutido sobre el conocimiento de la fisiología celular y ha permitido postular nuevos modelos para explicar las vías metabólicas complejas. Un ejemplo claro lo constituye la visión adquirida sobre la biosíntesis de hormonas esteroideas (88,89,91,100,134) que ha permitido establecer que: i) el número de enzimas implicados en la esteroidogénesis es restringido, ii) en general y para cada especie los enzimas son idénticos en los diferentes tejidos, iii) los enzimas esteroidogénicos guardan similitudes estructurales que sugieren un origen filogenético común, iv) los enzimas esteroidogénicos catalizan en general más de una reacción simultáneamente.

Aunque en líneas generales pueden admitirse como válidas estas generalizaciones, no debe perderse de vista que cada uno de los puntos anteriores se apoya en evidencias experimentales de consistencia variable (80). Esta aseveración es particularmente cierta en lo que al número de reacciones que cataliza cada enzima se refiere (80,88,89,91,134).

En la investigación que presentamos se estudió de la deshidrogenación de los 3 β -hidroxi-5-en-esteroides y la posterior isomerización de los correspondientes 3-ceto-5-en-esteroides a 3-ceto-4-en-esteroides que es catalizada por un solo enzima (67-69,138) a pesar de los datos iniciales que postulaban la existencia de distintos enzimas para ambas actividades o, como mínimo, la existencia de isoenzimas tisulares (81,124-126).

Los primeros estudios bioquímicos e histoquímicos sugirieron que el enzima se localiza en el retículo endoplásmico liso o microsomas (15,30,57-59,74,90,108), en mitocondrias (11) o en ambos compartimentos (80). Sin embargo, estudios recientes usando técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti 3 β -HSD demostraron que el enzima está localizado exclusivamente en la membrana del retículo endoplásmico de células adrenales (39,70), Leydig y ovario (40,41).

Consecuentemente en los experimentos realizados para caracterizar el enzima 3 β -HSD se usó como fuente del enzima la fracción microsomal de testículo y ovario. Tal y como se detalló en la sección de Resultados, el detergente zwitteriónico Chaps permitió extraer

hasta el 90% del enzima de membranas microsomales de ambos tejidos, que se purificó 200-300 veces después de seguir el protocolo detallado en la sección correspondiente de Material y Métodos.

Los experimentos iniciales demostraron que la preparación del enzima podía mantener indefinidamente su actividad (> 2 meses) en tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7.4) en presencia de glicerol al 20%. Esta preparación revelaba 8-10 bandas de proteínas por tinción con plata de geles SDS. Sin embargo, aunque la preparación del enzima con que se realizaron los distintos experimentos no era pura, en las condiciones de ensayo utilizadas y aplicando distintos sistemas de solventes (96,113) para separar los productos de las P-450_{c₁₇} (17 α -pregnenolona, Dhea, 17 α Pro y Δ^4 -Adiona) o 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Dhea, Adiol, Δ^4 -Adiona y Test) demuestran que para cada sustrato sólo se obtenía un producto de reacción.

Como método de medida se adaptó el método radioenzimático inicialmente descrito por Murono y Payne (92), y modificado en este laboratorio para ser adaptado a células testiculares y ováricas mantenidas en cultivo primario (49-51,106).

El método de medida inicial se basa en la conversión de ^3H -pregnenolona en el correspondiente 3-cetoesteroide (progesterona) usando NAD^+ como coenzima. Este método ofrece mayor fiabilidad que otros métodos radioenzimáticos basados en la precipitación de los 3 β -hidroxiesteroides con digitonina (99,14) de uso anterior en este laboratorio (16). No obstante, el método de precipitación se utilizó como sistema de detección rápido de la actividad enzimática durante los experimentos de purificación.

En el presente trabajo se usaron, además de la pregnenolona, los otros sustratos fisiológicos del enzima (17 α Pre, Dhea, Adiol). Las condiciones de ensayo se fijaron de tal forma que la transformación de todo sustrato fueran <15%, adaptando los tiempos de incubación a los rangos de concentración de sustrato en los distintos experimentos (79).

Se investigaron secuencialmente, para el enzima de testículo y ovario, los

requerimientos de NAD^+ en función de cada sustrato, las K_M para cada sustrato, el efecto de los productos de la reacción (Pro, $17\alpha\text{Pro}$, $\Delta^4\text{-Adiona}$ y Test) y de otros esteroides naturales (DHT, $\alpha\text{-Diol}$, $\beta\text{-Diol}$, E_1 y E_2) sobre la velocidad de transformación del sustrato en su correspondiente producto. Además, se realizaron experimentos de competición entre los distintos sustratos y se calcularon las K_i a partir de las K_M^s e ID_{50} . Por otro lado, se calcularon las eficacias catalíticas para los dos enzimas con los cuatro sustratos, a partir de los datos de $V_{\max}$ y K_M .

Es interesante recalcar, que el enzima puede medirse de forma menos laboriosa siguiendo la reacción a 340 nm en función del NADH generado durante la reacción tal y como han hecho otros investigadores (54,66-69). La realización de los estudios de competición entre los distintos sustratos, que hemos realizado de forma exhaustiva en los experimentos descritos en las Figuras 15-22, no podrían, sin embargo, llevarse a cabo por este método espectrofotométrico ya que el efecto sobre la concentración de NADH sería aditivo (20).

Además del efecto competitivo de los sustratos individuales entre sí, se realizaron aproximaciones a situaciones fisiológicas estudiando la velocidad de la reacción en mezclas de sustrato (a concentraciones próximas a K_M o saturantes) donde sólo uno de los sustratos estaba isotópicamente marcado.

Puesto que la FSH induce la diferenciación de la CG ovárica, que incluye cambios morfológicos y bioquímicos entre los que destaca un aumento de la esteroidogénesis (65), se estudió el efecto de esta hormona sobre la actividad del enzima de CG mantenidas en cultivo primario (50). En estos experimentos también se midió por RIA la producción de progesterona y estradiol cuyos datos se dan en el pie de la tabla correspondiente.

Dado que la FSH está acoplada al sistema adenilato ciclasa (AC) por proteínas G (65) y los agentes que aumentan o simulan niveles altos de AMPc intracelular mimetizan los efectos de la hormona, también se estudió el efecto del But_2AMPc sobre la actividad del enzima. En ambos experimentos se midió la actividad d $3\beta\text{-HSD}$ usando los cuatro

sustratos del enzima.

Los experimentos presentados revelan que el enzima de ovario es unas cinco veces más activo que el de testículo. Este dato hay que tomarlo con ciertas reservas, puesto que el enzima testicular se encuentra exclusivamente en las células de Leydig que abarca sólo el 5% de todas las células testiculares (118,120). Sin embargo, en el ovario las células de la teca, teca intersticio, granulosa y luteales, poseen actividad 3 β -HSD (46,65,129). Ello implica que la aparente diferencia en actividad podría deberse exclusivamente a una mayor cantidad de enzima en la preparación.

Al estudiar los requerimientos de NAD⁺ con los distintos sustratos del enzima (Tabla Resumen II) se demuestra que las K_M^{NAD} son distintas para cada sustrato en testículo (17 α Pre > Pre $\approx$ Adiol > Dhea) y ovario (17 α Pre > Pre > Adiol > Dhea). Además, usando concentraciones saturantes de NAD⁺ (0.6 mM), las K_M^s revelan secuencias distintas a las anteriores, tanto para testículo (17 α Pre > Adiol > Pre $\approx$ Dhea) como para ovario (17 α Pre > Adiol > Pre > Dhea).

Considerando que las V_{max} siguen la secuencia Pre $\approx$ Adiol > Dhea > 17 α Pre, para ambos órganos, puede concluirse que es la afinidad por sustrato y NAD⁺ conjuntamente lo que condiciona la V_{max} del enzima, tal y como se demuestra por los datos de eficacia catalítica, recogidos en la Tabla Resumen V. Puede observarse que la eficacia catalítica (V_{max}/K_M) sigue las secuencias Pre > Dhea > Adiol > 17 α Pre (testículo) y Dhea > Pre > > Adiol > > 17 α Pre (ovario). Estas son similares a las secuencias de K_M^s para el enzima de ambos tejidos. El análisis de los datos de la Tabla Resumen V revela, además, que la eficacia catalítica del enzima de ovario es 4 veces superior al de testículo. Este dato, de nuevo, hay que tomarlo con precaución puesto que en el cálculo de la eficacia catalítica se asume que $V_{max} = K_{cat} \times E_T$, donde K_{cat} es la constante catalítica de la reacción y E_T la concentración total de enzima que, probablemente, no es la misma en ambas preparaciones tal y como discutimos con anterioridad (46,65,118,120,129).

El enzima 3 β -HSD convierte los 3 β -hidroxiesteroides usados como sustrato en

progesterona, 17α -hidroxiprogesterona, Δ^4 -androstendiona y testosterona. La transformación de los distintos 3β -hidroxiesteroides por acción de las P-450 hidroxilasas y la conversión relativa de estos intermediarios a Δ^4 -cetoesteroides puede proporcionar una visión del flujo de la vía en el estado estacionario (88,89,134). Dependiendo de los tejidos, la testosterona puede, además, ser reducida a dihidrotestosterona y sus metabolitos o ser aromatizado a estradiol (80).

Estudios previos sugieren inhibición del enzima de testículo, ovario, adrenales y placenta por los productos de la reacción y otros esteroides de la vía al usar como sustrato pregnenolona o dehidroepiandrosterona (20,56,57,67-69,124-126,129). En la presente memoria se han reevaluado estos resultados. Con las evidencias experimentales que se aportan se demuestra la necesidad de tener en cuenta, como precaución, el tipo de sustrato que se utiliza en los ensayos. Los resultados presentados sugieren que sólo en ovario y usando pregnenolona como sustrato hay inhibición apreciable de la reacción, con la secuencia $\text{Pro} \approx \text{Test} > 17\alpha\text{Pro} > \Delta^4\text{-Adiona}$. Para el testículo sólo se observaron inhibiciones si se usa $17\alpha\text{Pre}$ como sustrato, y la potencia relativa del efecto sigue el orden $\text{Pro} > \Delta^4\text{-Adiona} > \text{Test} > 17\alpha\text{Pro}$. En cualquier caso, la relevancia fisiológica de estos efectos es dudosa puesto que las concentraciones de inhibidor usados como producto final son 10 veces las de sustrato que se encuentran en el interior de las células o su entorno. Estas concentraciones impiden el cálculo de K_i por métodos cinéticos (38).

El estudio de la inhibición por otros esteroides, no obstante, revela efectos inhibitorios a concentraciones equimolares de sustrato e inhibidor. A efectos comparativos se incluyó en este estudio la cianoketona, un potente inhibidor del enzima (127,132). Los efectos de E_1 , E_2 y β -Diol fueron distintos para testículo y ovario, y de distinta magnitud según el sustrato utilizado.

Aunque no se realizan estudios exhaustivos de inhibición con otros esteroides naturales o sintéticos, puede recalcar que en estudios de inhibición del enzima es necesario estudiar los cuatro sustratos fisiológicos. Esto es particularmente importante por cuanto inhibidores del enzima pueden ser -y son- agentes de uso terapéutico (22,127,132).

Los estudios de desplazamientos permitieron determinar las ID_{50} recogidas en la **Tabla Resumen III**. A partir de estos datos y de los valores de K_M^s de la **Tabla Resumen II** se determinaron las K_i usando la ecuación descrita en Material y Métodos, asumiendo que cada sustrato actúa como inhibidor competitivo de otro único sustrato. Esta aproximación es posible, al ajustarse nuestros datos experimentales a una cinética tipo Michaelis-Menten ya establecida por otros investigadores (20,127). Estos experimentos demuestran que existe una preferencia por el centro activo del enzima de testículo y ovario que sigue la secuencia $Pre \approx Dhea > Adiol$ que concuerda con los datos de eficacia catalítica de la **Tabla Resumen V**. La $17\alpha Pre$ reveló ser el sustrato menos preferente de los cuatro.

Puesto que es dudoso que en condiciones fisiológicas compitan sólo dos sustratos por el centro activo del enzima, se realizaron experimentos adicionales con los cuatro sustratos presentes en la mezcla de reacción, pero sólo uno de ellos marcado radiactivamente. Estos experimentos se realizaron con mezclas de los cuatro sustratos a concentraciones de K_M o saturantes ($8 \mu M$) para cada esteroide. Los resultados revelan que la preferencia $Pre \approx Adiol > Dhea$ con un solo sustrato, pasa a ser $Adiol > Dhea > Pre$ con los cuatro sustratos a concentraciones de K_M y $Dhea > Adiol$ a concentraciones saturantes de los cuatro sustratos. Los datos de V_{max} obtenidos en estos experimentos revelan que en presencia simultánea de los cuatro sustratos y sus concentraciones relativas condicionan el flujo $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ en ovario y testículo. Considerando, además, la ausencia de efectos inhibitorios de los Δ^4 -cetoesteroides sobre la actividad del enzima de ambos órganos, puede postularse que el enzima se regula por las concentraciones relativas de los sustratos de la reacción.

Los enzimas de la esteroidogénesis guardan homologías de secuencias considerables (100), aunque éstas no han sido comparadas con la secuencia del enzima 3β -HSD deducida a partir del correspondiente cDNA.

Los datos, hasta el momento, sugieren que el enzima está constituido por un único polipéptido de 372 aminoácidos que convierte 3β -hidroxiesteroides en 3-cetoesteroides y que existen diferencias significativas en las secuencias de aminoácidos del enzima de

distinto origen (40,41,76,85,125,136-138). Estas diferencias podrán explicar i) las diferencias entre K_M^{NAD} (Pre, Dhea) y $K_M^{17\alpha Pre}$, K_M^{Dhea} y K_M^{Adiol} de los enzimas de testículo y ovario, ii) la inhibición preferente de la actividad enzimática por unos compuestos u otros dependiendo del origen del enzima y/o el sustrato utilizado, iii) el comportamiento dispar de la actividad enzimática cuando se ensaya con un solo sustrato o en presencia de los otros sustratos a concentraciones variables, iv) las diferencias de eficacia catalítica entre ambos tejidos y para los distintos sustratos.

Se estudió en CG mantenidas en cultivo primario el efecto de la FSH sobre la activación del enzima 3 β -HSD (50,51). Puesto que la FSH activa la Adenil-ciclase y aumenta los niveles intracelulares de AMPc (65), se realizaron experimentos adicionales para investigar la activación del enzima por el derivado But₂AMPc capaz de atravesar la membrana celular y activar directamente la cadena de fosforilaciones dependientes de AMPc (65).

Los resultados son diferentes dependiendo del experimento, observándose para la FSH la secuencia de activación Pre $\approx$ Adiol > 17 α Pre > Dhea y una activación idéntica para los cuatro sustratos en células estimuladas por But₂AMPc. Este hecho no es sorprendente ya que la dosis de FSH utilizada fue máxima, mientras que para el análogo no metabolizable del AMPc la dosis fue baja debido a la alta toxicidad del producto. Las diferencias en la velocidad de transformación pueden estar relacionadas también con el hecho de haberse realizado estos experimentos con homogeneizados de células puras que no constituyen más del 1% de las células totales del ovario adulto, sugiriendo nuevamente una especificidad celular del enzima.

VI CONCLUSIONES

1. Se han usado preparaciones parcialmente purificadas para el estudio de los parámetros cinéticos aparentes del enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa de ovario y testículo. Estas preparaciones convierten cada sustrato en un único producto de la reacción, tal y como se demostró usando cada sustrato radiactivo y separando los esteroides de las vías Δ^5 y Δ^4 por distintos sistemas de solventes.
2. La actividad del enzima se midió por un método radioenzimático que permite medir, sin interferencias, los parámetros cinéticos del enzima con dos o más sustratos simultáneamente y calcular las constantes cinéticas de cada sustrato. Este método experimental permite, además, el cálculo de las K_i de cada sustrato a partir de las K_M^s e ID_{50} y las eficacias catalíticas a partir de K_M^s y V_{max} .
3. Independientemente del sustrato utilizado la actividad específica del enzima de ovario es más alta que la de testículo. Sin embargo, este dato hay que tomarlo con reserva puesto que puede reflejar simplemente distinta abundancia relativa de ambos enzimas en los respectivos tejidos. A la hora de interpretar los datos de eficacia catalítica en ambos tejidos debe tenerse la misma precaución.
4. El enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tiene K_M^{NAD} distintas en función del sustrato utilizado. Aunque la secuencia es análoga para ambos tejidos (testículo: $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} \approx \text{Pre} > \text{Dhea}$; ovario: $17\alpha\text{Pre} > \text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Dhea}$), éstas no guardan relación con la secuencia común de V_{max} para ambos enzimas ensayada con un solo sustrato ($\text{Pre} \approx \text{Adiol} > \text{Dhea} > 17\alpha\text{Pre}$). Usando Adiol o $17\alpha\text{Pre}$ como sustrato las K_M^{NAD} son similares en ambos tejidos. Sin embargo, se encuentran diferencias significativas entre los valores de las K_M^{NAD} de testículo y ovario si el sustrato utilizado es Pre o Dhea.
5. La K_M^s del enzima para cada sustrato es diferente, pero sigue secuencias parecidas para ambos tejidos (testículo: $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Pre} \approx \text{Dhea}$; ovario: $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Pre} > \text{Dhea}$). Estas secuencias tampoco son relacionables con la secuencia común de V_{max} de testículo y ovario ($\text{Pre} \approx \text{Adiol} > \text{Dhea} > 17\alpha\text{Pre}$). La K_M^s para Pre es idéntica

en ambos tejidos (Testículo: $0.20 \pm 0.01 \mu\text{M}$; Ovario: $0.26 \pm 0.01 \mu\text{M}$). Sin embargo, las correspondientes a $17\alpha\text{Pre}$, Dhea y Adiol son significativamente diferentes para ambos enzimas.

6. Las K_M^s calculadas para ambos tejidos concuerdan con la capacidad para desplazar o ser desplazados del centro activo. Así, Dhea desplaza a los otros sustratos con una secuencia similar para ambos enzimas: $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} \approx \text{Pre}$. La Pre desplaza a los otros sustratos con un orden de potencia $17\alpha\text{Pre} > \text{Adiol} > \text{Dhea}$ y el Adiol sólo es capaz de desplazar eficazmente del centro activo a $17\alpha\text{Pre}$ en testículo ($\text{ID}_{50} = 1 \mu\text{M}$) y en ovario ($\text{ID}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$). Los estudios de competición de los distintos sustratos revelan que $17\alpha\text{Pre}$ no compete eficazmente por el centro activo del enzima con los otros sustratos de la reacción.
7. A partir de ID_{50} y K_M^s se calcularon las K_i de cada sustrato frente a los demás, y revelan que la Dhea es un inhibidor competitivo potente de los demás sustratos del enzima, con valores comprendidos entre $0.15\text{-}0.32 \mu\text{M}$ (testículo) y $0.35\text{-}0.77 \mu\text{M}$ (ovario). Las K_i de pregnenolona frente a los otros sustratos ocupan una posición intermedia entre Dhea y Adiol y la única K_i calculable para $17\alpha\text{Pre}$ es cuando se usa Pre como sustrato en ovario.
8. El estudio del efecto inhibitorio de los Δ^4 -cetoesteroides sobre la actividad del enzima no permite postular que para el caso concreto de ovario y testículo existan mecanismos reguladores de la transformación $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ por los productos finales de la reacción (Pro, $17\alpha\text{Pro}$, Dhea, Adiol). En cualquier caso, en condiciones fisiológicas e independiente de la actividad P-450_{17 α} la acumulación de Δ^4 -esteroides no tendría efectos significativos sobre la actividad del enzima. Al usar otros esteroides naturales se observa que, independientemente del sustrato utilizado, el β -Diol, E_1 y E_2 son los únicos esteroides capaces de inhibir la actividad del enzima de testículo y ovario, con un orden de potencia $E_1 \approx E_2 > \beta\text{-Diol}$ y $E_1 > E_2 \approx \beta\text{-Diol}$ respectivamente. En cualquier caso, los efectos de los distintos inhibidores varía según el sustrato utilizado.

9. El estudio de la transformación de cada sustrato en mezclas de los cuatro sustratos, revela las secuencias $\text{Adiol} > \text{Dhea} > \approx 17\alpha\text{Pre} > \text{Pre}$ y $\text{Adiol} > > \text{Pre} \approx \text{Dhea} > 17\alpha\text{Pre}$ para testículo y ovario respectivamente, usando cada sustrato a una concentración equivalente a su K_M . Cuando se usan concentraciones saturantes de todos los sustratos las secuencias para testículo ($\text{Dhea} > \text{Adiol} > > 17\alpha\text{Pre} \approx \text{Pre}$) y ovario ($\text{Dhea} > \text{Adiol} > > \text{Pre} > > 17\alpha\text{Pre}$) difieren entre sí y de las anteriores. Estos resultados permiten sugerir que la actividad del enzima es regulada por la concentración de sustrato y no por los productos de la reacción.

10. Los resultados presentados permiten plantear que las diferencias de K_M^{NAD} , k_M^S , ID_{50} , K_i , inhibición por producto final, velocidad de transformación simultánea de los cuatro sustratos y eficacia catalítica, entre los enzimas de testículo y ovario, pueden deberse a diferencias en la estructura primaria del enzima.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. **Abul-Hajj YJ.** Metabolism of dehydroepiandrosterone by hormone dependent and hormone independent human breast carcinoma. *Steroids*. **26**: 488-500 (1975).
2. **Ahmad N, Warren DW.** Testosterone metabolism by testicular tissue. *J Androl*. **4**: 82-87 (1983).
3. **Albrecht ED, Pepe GJ.** Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev*. **11**: 124-150 (1990).
4. **Andersen JM, Dietschy JM.** Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis of the rat. *J Biol Chem*. **253**: 9024-9030 (1978).
5. **Ardies CM, Lasker JM, Boswick BP, Lieber CS.** Purification of NADPH:cytochrome c (cytochrome P-450) reductase from hamster liver microsomes by detergent extraction and affinity chromatography. **162**: *Anal Biochem*. 36-49 (1987).
6. **Armstrong DT, Papkoff H.** Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats "in vitro" by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. **99**: 1144-1151 (1976).
7. **Asibey-Berko E, Thomas JL, Strickler RC.** 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human placental microsomes and mitochondria: co-solubilization of androstene and pregnene activities. *Steroids*. **47**: 351-363 (1986).
8. **Azhar S, Ida Chen YD, Reaven GM.** Gonadotropin modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A activity in desensitized luteinized rat ovary. *Biochemistry*. **25**: 4533-4538 (1984).
9. **Azhar S, Kahn I, Ida Chen YD, Reaven GM, Gibori G.** Regulation of luteal cell 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by estradiol. *Biol Reprod*. **32**: 333-341 (1985).
10. **Baird DT.** Amenorrhea, anovulation, and dysfunctional uterine bleeding. En: *Endocrinology*. De Groot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1950-1969 (1989).
11. **Basch RS, Finegold MJ.** 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mitochondria of rat adrenal homogenates. *Biochem J*. **125**: 983-989 (1971).
12. **Batzold FH, Benson AM, Covey DF, Robinson CH, Talalay P.** The Δ^5 -3-ketosteroid isomerase reaction: catalytic mechanism, specificity and inhibition. *Adv Enz Regul*. **14**: 243-267 (1976).
13. **Baxter JD, Frohman LA, Broadus AE, Felig P.** Panorama de la evolución, funciones y organización del sistema endocrino. En: *Endocrinología y metabolismo*. McGraw Hill, México, pp 17-30 (1983).

14. Berko EA, Thomas JL, Strickler RC. A modified digitonin precipitation radioassay for 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase. *Anal Biochem.* **163**: 36-41 (1987).
15. Beyer KF, Samuels LT. Distribution of steroid-3 β -ol-dehydrogenase in cellular structures of the adrenal glands. *J Biol Chem.* **219**: 69-76 (1956).
16. Blanco FL, Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM. The effect of insulin and luteinizing hormone treatment on serum concentrations of testosterone and dihydrotestosterone and testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in intact and hypophysectomized diabetic rats. *Endocrinology.* **109**: 1248-1253 (1981).
17. Bongiovanni AM, Kellenbenz G. The androgenital syndrome with deficiency of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Invest.* **41**: 2086-2092 (1962).
18. Bradbury S, Steward VW. A note on the electron staining of diformazan deposits in tissue sections. *J R Microsc Soc.* **83**: 467-470 (1964).
19. Bradford MM. A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254 (1976).
20. Brandt M, Levy MA. 3 β -hydroxysteroid- Δ^5 -steroid dehydrogenase/3-keto- Δ^5 -steroid isomerase from bovine adrenals: mechanism of inhibition by 3-oxo-4-aza steroids and kinetic mechanism of the dehydrogenase. *Biochemistry.* **28**: 140-148 (1989).
21. Brandt RB, Laux JE, Yates SW. Calculation of inhibitor K_i and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50% inhibition for Michaelis-Menten enzymes. *Biochem Med.* **37**: 344-349 (1987).
22. Brinkmann A, Leemborg I, Rommerts F, Van der Molen H. Translocation of the testicular estradiol receptor is not an obligatory step in the gonadotropin-induced inhibition of C₁₇₋₂₀ lyase. *Endocrinology.* **110**: 1834-1836 (1982).
23. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis and the adrenal cortex. *Recent Prog Hormone Res.* **35**: 215-257 (1979).
24. Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMGCoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *L Lip Res.* **21**: 505-517 (1980).
25. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem.* **52**: 223-261 (1983).
26. Chang TY, Doolittle GM. Acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase. The enzymes. **16**: 523-539 (1983).

27. Chedrese PJ, Luu-The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. Evidence for the regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotrophin in luteinized porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 126: 2228-2230 (1990).
28. Chen HW. Role of cholesterol metabolism in cell growth. *Federation Proc*. 43: 126-130 (1984).
29. Chew PCT, Ratnam SS, Goh HH. Testosterone in the molar vesicle fluid and theca-lutein cyst fluid. *Br J Obstet Gynaec*. 85: 218-220 (1978).
30. Cowan RA, Giles CA, Grant JK. The intramitochondrial distribution of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-oxosteroid isomerase. A probable redistribution artifact. *J Steroid Biochem*. 5: 607-608 (1974).
31. Crabbé J. Mechanism of action of aldosterone. En: *Endocrinology*. DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, pp 1572-1582 (1989).
32. Cravioto MDC, Ulloa-Aguirre A, Bermúdez JA, Herrera J, Lisker R, Mendez JP, Perez-Palacios G. A new variant of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase deficiency syndrome: evidence for the existence of two enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*. 63: 360-366 (1986).
33. Damber JE, Bergh A, Selstam G, Södergard R. Estrogen receptor and aromatase activity in the testes of the unilateral cryptorchid rat. *Archives of andrology*. 11: 259-263 (1983).
34. Dawood MY. Progesterone in molar vesicle fluid and theca lutein cyst fluid. *Obstet Gynec*. 45: 531-536 (1975).
35. Dawood MY, Saxena BB. Serum testosterone and dihydrotestosterone in patients with trophoblastic disease. *Obstet Gynec*. 47: 684-688 (1976).
36. De Paillerets C, Gallay J, Alfsen A. Effect of cholesterol and protein content on membrane fluidity and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mitochondrial inner membranes of bovine adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta*. 772: 183-191 (1984).
37. Dixon M, Weeb EC. *Enzymes*. Academic Press, New York (1979).
38. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*. 137: 143-144 (1953).
39. Doody KM, Carr BR, Rainey WE, Byrd W, Murry BA, Strickler RC, Thomas JL, Mason JJ. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase in the fetal zone and neocortex of the human fetal adrenal gland. *Endocrinology*. 126: 2487-2492. (1990).

40. Dupont E, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G. Light microscopic immunocytochemical localization of 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in the gonads and adrenal glands of the guinea pig. *Endocrinology*. 126: 2906-2909 (1990).
41. Dupont E, Zhao HF, Rhéaume E, Simard J, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G. Localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase in rat gonads and adrenal glands by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology*. 127: 1394-1403 (1990).
42. Edwards DP, O'Conner JL, Bransome ED, Braselton WE. Human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Δ^5 -isomerase. *J Biol Chem*. 251: 1632-1638 (1976).
43. Ehrlich EN. Electrolyte metabolism. En: DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1582-1601 (1989).
44. Ehrmann DA, Rosenfield RL. Gonadotropin-releasing hormone agonist testing of pituitary-gonadal function. *Trends Endocrinol Metab*. 2: 86-91 (1991).
45. England BG, Niswender GD, Midgley AR. Radioimmunoassay of estradiol 17 β without chromatography. *J Clin Endocrinol Metab*. 38: 42-47 (1974).
46. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of a structure/function relationships. *Endocr Rev*. 6: 371-399 (1985).
47. Ewald W, Werbin H, Chaikoff IL. Evidence for two substrate-specific Δ^5 -3-ketosteroid isomerases in beef adrenal glands, and their separation from 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 81: 199-203 (1964).
48. Ewald W, Werbin H, Chaikoff IL. Partial separation of beef adrenal Δ^5 -3-ketosteroid isomerase: androst-5-ene-3,17 dione isomerase and pregn-5-ene-3,20-dione isomerase. *Steroids*. 4: 759-764 (1964).
49. Fanjul LF, Estévez F, Déniz A, Marrero I, Benítez L, Quintana J, González J, Centol I, Ruiz de Galarreta CM. R1881 regulation of steroidogenesis in cultured testicular cells. *Biochem Internat*. 19: 301-312 (1989).
50. Fanjul LF, Estévez F, Déniz A, Marrero I, Benítez L, Centol I, Quintana J, González J, Llanes L, Ruiz de Galarreta CM. The androgen receptor does not mediate progestin regulation of progesterone biosynthesis in cultured rat granulosa cells. *Biochem Internat*. 19: 977-984 (1989).
51. Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM, Hsueh AJW. Progestin augmentation of gonadotropin stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 112:405-407 (1983).
52. Feldman D. Mechanism of action of cortisol. En: *Endocrinology*. De Groot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1557-1572 (1989).

53. Ferre F, Breuiller M, Cedard L, Duchesne MJ, Saintot M, Descomps B, Crastes de Paulet A. Human placental Δ^5 -3 β hydroxysteroid dehydrogenase activity (Δ^5 -3 β HSD): intracellular distribution, kinetic properties, retroinhibition and influence of membrane delipidation. *Steroids* 26: 551-571 (1975).
54. Ford HC, Engels LL. Purification and properties of the Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase system of sheep adrenal cortical microsomas. *J Biol Chem.* 249: 1363-1368 (1974).
55. Frieson HG, Cowden EA. Lactation and galactorrhoea. En: *Endocrinology*. DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 2070-2087 (1989).
56. Genti-Raimondi S, Olivier NS, Patrino LC, Flury A. Regulation of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissue fragments and microsomes from human term placenta: kinetic analysis and inhibition by steroids. *J Steroid Biochem.* 32: 413-420 (1989).
57. Genti-Raimondi S, Olivier NS, Patrino LC, Flury A. Kinetic analysis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in microsomes from complete hydatidiform mole. *J Steroid Biochem.* 36: 149-152 (1990).
58. Gibb W, Lavoie JC, Roux JF. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human fetal membranes. *Steroids.* 32: 365-372 (1978).
59. Gibb W, Lavoie JC, Morin-Gonthier M. Kinetic comparison of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human placenta, chorion laeve, and ovary. *Can J Biochem Cell Biol.* 63: 183-186 (1985).
60. Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor mediated endocytosis. *Nature.* 279: 679-685 (1979).
61. Gore-Langton RE, Dorrington JH. FSH induction of aromatase in cultured rat granulosa cells measured by radiometric assay. *Mol Cell Endocrinol.* 22: 135-151 (1981).
62. Greenwald GS, Terranova PF. Follicular selection and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill J (Eds). Raven Press, New York. 387-345 (1988).
63. Gwynne J, Straus JF. The role of lipoproteins in steroidogenic and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* 3: 299-312 (1982).
64. Ho PC, Wong LC, Ma HK. Plasma prolactin, progesterone, estradiol, and human chorionic gonadotropin in complete and partial moles before and after evacuation. *Obstet Gynec.* 67: 99-106 (1986).
65. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5: 76-127 (1984).

66. Inano H, Hayashiyama J, Tamaoki BI. Solubilization of Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase with Δ^5 - Δ^4 isomerase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from rat testicular microsomal fraction by several detergents. *J Steroid Biochem.* 16: 587-593 (1982).
67. Ishii-Ohba H, Saiki N, Inano H, Tamaoki BI. Purification and characterization of rat adrenal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase with steroid 5-ene-4 ene-isomerase. *J Steroid Biochem.* 24: 753-760 (1986).
68. Ishii-Ohba H, Inano H, Tamaoki BI. Purification and properties of testicular 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and 5-ene-4-ene isomerase. *J Steroid Biochem.* 25: 555-560 (1986).
69. Ishii-Ohba H, Inano H, Tamaoki BI. Testicular and adrenal 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and 5-ene-4-ene isomerase. *J Steroid Biochem.* 27: 775-779 (1987).
70. Ishimura K, Yoshinaga-Hirabayashi T, Fujita H, Ishii-Ohba H, Inano H, Tamaoki B. Light and electron microscopic immunocytochemistry on the localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the bovine adrenal cortical cells. *Histochemistry.* 89: 35-39 (1988).
71. Jaffe ML, Munson PJ, Rodbard D. Four parameter logistic curve-fitting program for the TI-59 calculator. National Institutes of Health Bethesda, Md., USA. (1979).
72. Joshi NJ, Moodbidri SM, Nandedkar TD. Inhibition of Δ^5 -3 β hydroxysteroid dehydrogenase activity in pre-implantation mouse embryos and their implantation by sheep ovarian follicular fluid peptide. *Acta Endocr (Copenh).* 115: 183-188 (1987).
73. Kenigsberg D, Rosenwaks Z, Hodgen D. The ovary: development and control of follicular maturation and ovulation. En: *Endocrinology*. DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1915-1939 (1989).
74. Kimura T. Transduction of ACTH signal from plasma membrane to mitochondria in adrenocortical steroidogenesis. Effects of peptide, phospholipid, and calcium. *J Steroid Biochem.* 25: 1-6 (1986).
75. Kream BE, Sauer LA. On the intracellular localization of the 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase/isomerase in the rat adrenal cortex. *Proc Soc Exp Biol Med.* 152: 459-462 (1976).
75. Labrie F. Intraendocrinology. *Mol Cell Endocrinol.* 78: C113-C118 (1991).
76. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, Launoit Y, Guérin S, Leblanc G, Labrie F. Characterization of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 265: 20469-20475 (1990).

77. **Larner JM, Wiebe JP.** Microsomal 5-ene-3 β -hydroxysteroid oxidoreductase from pubertal rat leydig cells: partial purification and characterization. *J Steroid Biochem.* 18: 541- 550 (1983).
78. **Leatherbarrow RJ.** Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *TIBS.* 15: 455-458 (1990).
79. **Le Goff JM, Martin PM, Ojasoo T, Raynaud JP.** Non-Michaelian behavior of 5 α -reductase in human prostata. *J Steroid Biochem.* 33: 155-163 (1989).
80. **Lieberman S, Prasad VVK.** Heterodoux notions on pathways of steroidogenesis. *Endocr Rev.* 11: 469-493 (1990).
81. **Lorence MC, Murry BA, Trant JM, Mason JI.** Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5\rightarrow\Delta^4$ isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology.* 126: 2493-2498 (1990).
82. **Lowenstein WR.** Intercellular communication. *Scientific American.* 222: 78-86 (1970).
83. **Luu-The V, Lachance Y, Labrie C, Leblanc G, Thomas JL, Strickler RC, Labrie F.** Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol.* 3: 1310-1312 (1989).
84. **McNatty KP.** Follicular fluid. En: *The vertebrate ovary: comparative biology and evolutions.* R.E. Jones (Ed). Plenum Press, New York. 215-260 (1978).
85. **Martel C, Labrie C, Dupont E, Couët J, Trudel C, Rhéaume E, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Labrie F.** Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5\rightarrow\Delta^4$ isomerase expression and activity in the hypophysectomized rat ovary: interactions between the stimulatory effect of human chorionic gonadotropin and the luteolitic effect of prolactin. *Endocrinology.* 127: 2726-2737 (1990).
86. **McCune RW, Roberts S, Young PL.** Competitive inhibition of adrenal Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and Δ^5 -3-ketosteroid isomerase activities by adenosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 245: 3859-3867 (1970).
87. **Melb JC.** Diagnosis and treatment of primary aldosteronism and isolated hypoaldosteronism. En: *Endocrinology.* DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1708-1716 (1989).
88. **Miller WL.** Structure of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Steroid Biochem.* 27: 759-766 (1987).
89. **Miller WL.** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* 9: 295-398 (1988).

90. Moustafa AM, Koritz SB. Concerning the subcellular distribution of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the rat adrenal. *Proc Soc Exp Biol Med.* 149: 823-825 (1975).
91. Müller J. Aldosterone biosynthesis in bovine, rat and human adrenal: commonalities and challenges. *Mol Cell Endocrinol.* 78: C119-C124 (1991).
92. Murono EP, Payne AH. Testicular maturation in the rat. In vivo effect of gonadotropins on steroidogenic enzymes in the hypophysectomized immature rat. *Biol Reprod.* 20: 911-917 (1979).
93. Naville D, Rainey WE, Milewich L, Mason JI. Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} -isomerase expression by adrenocorticotropin in bovine adrenocortical cells. *Endocrinology.* 128: 139-145 (1991).
94. Neville AM, Engel LL. Steroid Δ -isomerase of the bovine adrenal gland: kinetics, activation by NAD and attempted solubilization. *Endocrinology.* 83: 864-872 (1968).
95. Odell ND. The menopause. En: *Endocrinology.* DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 2009-2015 (1989).
96. Osawa Y, Higashiyama T, Fronckowiak M, Yoshida N, Yarborough C. Aromatase. *J Steroid Biochem.* 27: 781-789 (1987).
97. Pang S, Levine LS, Stoner E, Opitz JM, Pollack MS, Dupont B, New MI. Nonsalt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J Clin Endocrinol Metab.* 56: 808-815.
98. Pastan I. Regulation and cellular growth. *Adv Metab Dis.* 8: 7-16 (1975).
99. Philpott JE, Perón FG. A microassay procedure for Δ^5 - 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase based on substrate depletion. *Endocrinology.* 88: 1082-1085 (1971).
100. Picado-Leonard J, Miller WL. Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. *Mol Endocrinol.* 2: 1145-1150 (1988).
101. Podesta EJ, Rivarola MA. Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology.* 95: 455-461 (1974).
102. Rajendran KG, Hwang J, Menon KMJ. Binding, degradation, and utilization of plasma high density and low density lipoproteins for progesterone production in cultured rat luteal cells. *Endocrinology.* 112: 1476-1752 (1983).
103. Rodbard D, Tacey RL. Radioimmunoassay dose interpolation based on the mass action law with antibody heterogeneity. *Anal Biochem.* 90: 13-21 (1978).

104. Roe CR, Kaplan NO. Purification and substrates specificities of bacterial hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochemistry*. **8**: 5093-5101 (1969).
105. Roselli CE, Ellinwood WE, Resko JA. Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology*. **114**: 192-200 (1984).
106. Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF, Meidan B, Hsueh JW. Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by human chorionic gonadotropin, androgens, and antiandrogens in cultured testicular cells. *J Biol Chem*. **258**: 10988-10996 (1983).
107. Samuels LT, Helmreich ML, Lasater MB, Reich H. An enzyme in endocrine tissues which oxidizes Δ^5 -3 hydroxy steroids to α,β unsaturated ketones. *Science*. **113**: 490-491 (1951).
108. Samuels LT, Helmreich ML. The influence of chorionic gonadotropin on the 3 β -ol dehydrogenase activity of testes and adrenals. *Endocrinology*. **58**: 435-442 (1956).
109. Schreiber JR, Weinstein DB, Hsueh AJW. Lipoproteins stimulate androgen production by cultured rat testis cells. *J Steroid Biochem*. **16**: 39-45 (1982).
110. Schuler LA, Toaff ME, Strauss JF. Regulation of cholesterol metabolism: control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Endocrinology*. **108**: 1476-1486 (1981).
111. Schultz RM, Groman EV, Engels LL. 3(17) β -hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomas testosteroni*. *J Biol Chem*. **252**: 3775-3783 (1977).
112. Shikita M, Talalay P. Preparation of highly purified 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases from *Pseudomonas* sp. *Anal Biochem*. **95**: 286-292 (1979).
113. Sikka SC, Swerdloff RS, Rajfer J. Assay system for simultaneous measurement of three steroidogenic enzyme activities in rat and human testis: effect of human chorionic gonadotropin. *Anal Biochem*. **149**: 72-86 (1985).
114. Simonian MH. ACTH and thyroid hormone regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human fetal adrenocortical cells. *J Steroid Biochem*. **25**: 1001-1006 (1986).
115. Simpson ER, Mason JJ, John ME, Zuber MX, Rodgers RJ, Waterman MR. Regulation of the biosynthesis of steroidogenic enzymes. *J Steroid Biochem*. **27**: 801-805 (1987).
116. Spona J. Differences in inhibition by various steroids of rat testis and *Pseudomonas Testosteroni* Δ^5 -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocr Experim*. **17**: 107-118 (1983).
117. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med*. **303**: 878-880 (1980).

118. Steinberger E, Steinberger A. Hormonal control of spermatogenesis. En *Endocrinology*. DeGroot LJ (Ed). WB Saunders Company, Philadelphia, pp 2132-2137 (1989).
119. Strauss JF, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lip Res*. 18: 99-137 (1981).
120. Tähhä KM. Current aspects of Leydig cell fuction and its regulation. *J Reprod Fert*. 78: 367-380 (1986).
121. Takahashi M, Luu-The V, Labrie F. Inhibitory effect of progestins 4-MA and cyanoketone on human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase $\Delta^5\rightarrow 4$ isomerase activity. *J Steroid Biochem*. 37: 231-236 (1990).
122. Takemori S, Kominami S. The role of cytochrome P-450 in adrenal steroidogenesis. *TIBS*. 9: 393-396 (1984).
123. Tanaka T, Billheimer JT, Strauss JR. Luteinized rat ovaries contain a sterol carrier protein. *Endocrinology*. 114: 533-538 (1984).
124. Thomas JL, Berko EA, Faustino A, Myers RP, Strickler RC. Human placental 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase: purification from microsomes, substrate kinetics, and inhibition by product steroids. *J Steroid Biochem*. 31: 785-793 (1988).
125. Thomas JL, Myers RP, Strickler R. Human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and steroid 5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzimases. *J Steroid Biochem*. 33: 209-217 (1990).
126. Thomas JL, Myers RP, Rosik LO, Strickler RC. Affinity alkylation of human placental 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase by 2 α -bromoacetoxy-progesterone: evidence for separate dehydrogenase and isomerase sites on one protein. *J Steroid Biochem*. 36: 117-123 (1990).
127. Takahashi M, Luu-The V, Labrie F. Inhibitory effect of synthetic progestins, 4-MA and cyanoketone on human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 $\rightarrow$ 4-ene-isomerase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 37: 231-236 (1990).
128. Tomkins EM. The metabolic code. *Science*. 189: 760-764 (1975).
129. Tonetta SA, De Vinna RS, diZerega GS. Thecal cell 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase activity: modulation by human chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 beta and dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem*. 28: 77-82 (1987).
130. Tonetta SA, diZerega GS. Intra gonadal regulation of follicular maturation. *Endocr Rev*. 10: 205-229 (1989).

131. Vahouny GW, Chanderbhan R, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD, Scallen TJ. Identification of adrenal sterol carrier protein₂ and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J Biol Chem.* **258**: 11731-11737 (1983).
132. Van der Vusse GJ, Kalkman ML, Van der Molen HJ. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis tissue inter- and subcellular localization and inhibition by cyanoketone and nagarse. *Biochim Biophys Acta.* **348**: 404-414 (1974).
133. Veldhuis JD, StraussJF, Silavin SL, Kolp LA. The role of cholesterol esterification in ovarian steroidogenesis: studies in cultured swine granulosa cells using a novel inhibitor of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Endocrinology.* **116**: 25-30 (1985).
134. Waterman MR, Lund J, Simpson ER. Complexity of steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *TEM.* **1**: 99-103 (1989).
135. Winters SJ, Takahashi J. Estrogens and cytosolic estrogen receptors in aged male rats. *J Androl.* **4**: 171-174 (1983).
136. Zhao HF, Simard J, Labrie C, Breton N, Rhéaume E, Luu-The V, Labrie F. Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid sequence of bovine 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase. *FEBS lett.* **259**: 153-157 (1989).
137. Zhao HF, Rhéaume E, Trudel C, Couët J, Labrie F, Simard J. Structure and sexual dimorphic expression of a liver specific rat 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase. *Endocrinology.* **127**: 3237-3239 (1990).
138. Zhao HF, Labrie C, Simard J, Launoit Y, Trudel C, Martel C, Rhéaume E, Dupont E, Luu-The V, Pelletier G, Labrie F. Characterization of rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding mRNAs in steroidogenic and peripheral tissues. *J Biol Chem.* **266**: 583-593 (1991).

VIII

LABOR INVESTIGADORA REALIZADA POR EL CANDIDATO DURANTE SUS ESTUDIOS DE TERCER CICLO

- 1. CRÉDITOS*
- 2. OTROS CURSOS REALIZADOS*
- 3. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES*
- 4. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS*
- 5. PERSPECTIVAS DE FORMACIÓN POSDOCTORAL*

1. CRÉDITOS

1.1. Curso académico 1987-88

Métodos de Investigación en Endocrinología Molecular. 5 créditos.

Maduración del Folículo Ovárico. 3 créditos.

Mecanismos de Transmisión de la Señal Hormonal. 3 créditos.

1.2. Curso académico 1988-89

Biología Molecular. 3 créditos.

Enzimología. 3 créditos.

Avances en Receptores de Hormonas Esteroideas. 3 créditos.

Metodología Avanzada en el Estudio de la Bomba de Sodio. 3 créditos.

1.3. Curso académico 1989-90

Técnicas Histoquímicas e Inmunohistoquímicas. 1 crédito.

Detección de Proteínas Celulares por Inmunocitoquímica e Immunoblot.

2 créditos.

Publicaciones. 9 créditos.

TOTAL CRÉDITOS: 35.

2. OTROS CURSOS REALIZADOS

Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Beckman Instruments España, S.A.

20-22 Febrero 1990 (24 horas lectivas).

Intensive Course in Immunology-Biotechnology.

Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

2-14 Octubre 1990 (120 horas lectivas).

Estrategias de Purificación de Proteínas.

Pharmacia LKB Biotecnología.

15-17 Octubre 1990 (24 horas lectivas).

3. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

XVI Congreso Nacional de Bioquímica.

Hidrólisis por HCG de un glicofosfolípido en célula granulosa: I. Marrero, L. Benítez, A. Déniz, F. Estévez, J. González, J. Quintana, C.M. Ruiz de Galarreta, J.M. Mato, F. Fanjul. Alicante. 1-4 Octubre 1989.

XVI Congreso Nacional de Bioquímica.

Actividad del enzima 3β -HSD/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa en célula granulosa y célula de Leydig: J. Quintana, J. González, A. Déniz, I. Frías, F. Estévez, L. Benítez, I. Marrero, L.F. Fanjul, C.M. Ruiz de Galarreta. Alicante. 1-4 Octubre 1989.

XVI Congreso Nacional de Bioquímica

Regulación de la esteroidogénesis en células testiculares neonatales mantenidas en cultivo primario: I. Centol, I. Marrero, A. Déniz, F. Estévez, L. Benítez, J. Quintana, J. González, L.F. Fanjul, C.M. Ruiz de Galarreta. Alicante. 1-4 Octubre 1989.

XX Congreso Nacional de Dermatología y Venerología.

Síndrome de Richner-Hanhart (Tirosinemia tipo II): F. Jiménez, I. Ponce, P. Santana, L. Benítez, J. Quintana, J. González. Mogán. 30 Mayo-1 Junio 1991.

15th International Congress of Biochemistry.

Diacylglycerol but not calcium mediates LHRH inhibitory effects on ovarian granulosa cell function: P. Santana, J. Quintana, J. González, L. Benítez, C.M. Ruiz de Galarreta, L.F. Fanjul. Jerusalén, Israel. 4-8 Agosto 1991.

15th International Congress of Biochemistry.

Ovarian and testicular 3β -hidroysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerase: studies with different substrates: J. Quintana, J. González, L.F. Fanjul, C.M. Ruiz de Galarreta. Jerusalén, Israel. 4-8 Agosto 1991.

15th International Congress of Biochemistry.

Glycosylphosphatidylinositol: a candidate system for prolactin signal transduction in ovarian granulosa cells: J. González, J. Quintana, P. Santana, L. Benítez, L.F. Fanjul, C.M. Ruiz de Galarreta. Jerusalén, Israel. 4-8 Agosto 1991.

4. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

4.1. Trabajos publicados

Fanjul LF, Estévez F, Déniz A, Marrero I, Benítez L, Quintana J, González J, Centol I, Ruiz de Galarreta CM. R1881 regulation of steroidogenesis in cultured testicular cells. *Biochem Int* 13: 147-158 (1989).

Fanjul LF, Estévez F, Déniz A, Marrero I, Benítez L, Centol I, Quintana J, González J, Llanes L, Ruiz de Galarreta CM. The androgen receptor does not mediate progestin regulation of progesterone biosynthesis in cultured rat granulosa cells. *Biochem Int* 19: 977-984 (1989).

4.2. Trabajos enviados o en prensa

Fanjul LF, Quintana J, González J, Benítez L, Santana P, Estévez F, Ruiz de Galarreta CM. Testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} isomerase in the hypophysectomized rat: effect of treatment with 5 α -dihydrotestosterone. *Journal of Endocrinology*

Fanjul LF, Santana P, Benítez L, Quintana J, González J, Ruiz de Galarreta, CM. R5020 enhances PGE₂ stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Experientia*.

Fanjul LF, Quintana J, Déniz A, González J, Benítez L, Ruiz de Galarreta CM. Diacylglycerol but not calcium mediates LHRH inhibitory effects on ovarian granulosa cell function. *Biochem Biophys Res Commun*.

Quintana J, González J, Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM. Ovarian and testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} isomerase: studies with different substrates. *Biochemical Journal*.

Fanjul LF, González J, Marrero I, Quintana J, Benítez L, Ruiz de Galarreta CM. Glycosylphosphatidylinositol: a candidate system for prolactin signal transduction in ovarian granulosa cells. *Endocrinology*.

Fanjul LF, Quintana J, González J, Benítez L, Marrero I, Ruiz de Galarreta CM. hCG stimulates PIG hydrolisis in cultured granulosa cells. *Endocrinology*.

5. PERSPECTIVAS DE FORMACIÓN POSDOCTORAL

Estoy aceptado por el Dr. M. Ascoli para estudiar como becario durante dos años de periodo posdoctoral en su laboratorio (Dpto. de Farmacología, Universidad de Iowa). El tema general de trabajo será el estudio de distintos productos oncogénicos en la regulación de la esteroidogénesis en células tumorales de Leydig.

Para realizar este estudio, he recibido una beca de la Comunidad Autónoma de Canarias para los próximos diez meses, que pienso renovar hasta totalizar 24 meses de estancia en USA. Para cubrir el primer año he recibido una ayuda complementaria de la Fundación Universitaria de Las Palmas.

Los beneficios específicos que pienso alcanzar desde el punto de vista científico son:

1. Perfeccionar habilidades generales de laboratorio, particularmente en el terreno del mantenimiento y control de líneas celulares.
2. Profundizar en el conocimiento práctico y teórico de los mecanismos de señalización intracelular.
3. Estudiar mediante técnicas de Biología Molecular la regulación del metabolismo celular especialmente en los siguientes aspectos:
 - a) Regulación de la expresión de enzimas y/o receptores específicos.
 - b) Estudio de los mecanismos moleculares que regulan esta expresión (síntesis y estabilización de RNAm, y síntesis de proteínas y modificación postraducciona de las mismas)
 - c) Participación de productos oncogénicos en la regulación del metabolismo celular.

Creo que cumplir estos tres apartados es fundamental para posteriormente poder actuar como investigador independiente.