

11261
7
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado

"SINTESIS DE PROGESTERONA EN PANCREAS CANINO:
DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LA DELTA5-
3BETA - HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA -
ISOMERASA"

T E S I S
Que para obtener el Grado de:
Maestro en Ciencias Biomédicas
(*Bioquímica*)
p r e s e n t a

MA. IRMA LOPEZ SOLACHE

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTODUCCION	1
OBJETIVOS	8
METODOLOGIA	
Preparación del tejido	8
Ensayo enzimático	9
RESULTADOS	
Localización subcelular	11
Identificación de los productos	12
Especificidad del co-substrato	13
Efecto de la concentración de proteína y el tiempo de incubación	15
Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática	17
Cinética de la saturación del substrato	19
DISCUSION	21
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUCCION

El páncreas es una glándula de secreción mixta, la cual realiza dos tipos de funciones: la exócrina, que se lleva a cabo en las células acinares cuyo principal producto son las enzimas digestivas; y la endócrina, que se lleva a cabo en los islotes de Langerhans, los cuales producen principalmente insulina y glucagon. En los últimos años se han acumulado evidencias en la literatura que permiten suponer la participación de las hormonas esteroides en la fisiología y patología pancreática.

Grossman *et. al.* demostraron en la rata que el mantenimiento de la citoarquitectura normal de las células acinares del páncreas es dependiente de hormonas esteroides. Esta dependencia es, sin embargo, diferente en las ratas hembra, que en las macho. En las ratas hembra es necesario hacer adrenalectomía y ovariectomía para que la morfología de las células acinares cambie, mientras que en el macho, la adrenalectomía es suficiente para observar cambios morfológicos en las células acinares. En las ratas hembra parece haber un control dual sobre el páncreas a través de hormonas corticoesteroides y estrogénicas; y en el macho, esta dependencia parece estar solamente regulada por las hormonas de la corteza suprarrenal (1).

Estudios cualitativos sobre la distribución de la radioactividad en los tejidos de ratones, después de la administración de

estrógenos marcados radiactivamente, señalan que el páncreas de los animales tratados capta cantidades relativamente altas de estas hormonas, las cuales se detectan por autoradiografía hasta 4 horas después de la inyección del estrógeno radiactivo. La radiactividad se deposita principalmente en la parte exócrina del páncreas, mas que en los islotes de Langerhans (2). Empleando biopsias, Kirdani *et al.*, estudian la distribución de la radiactividad en tejidos y fluidos biológicos de perros y mandriles macho, después de la inyección simultanea de pares de andrógeno-estrógeno marcados con isotopos radiactivos diferentes. Las muestras de tejido se obtuvieron del mismo animal a intervalos de 15 min durante un periodo de 2 horas. Con excepción del hígado, una de cuyas funciones es conjugar y excretar esteroides a la bilis, en ambas especies, la localización pancreática de radiactividad asociada a las hormonas perduró mas tiempo y excedió en gran medida la cantidad retenida en los demás tejidos estudiados, incluyendo órganos esteroideogénicos o excretorios como prostata, testiculo y riñon [Fig. 1]. La posibilidad de que el páncreas, de manera similar al hígado, pudiera conjugar o excretar esteroides a través del jugo pancreático, fue descartado por los mismos autores utilizando animales con drenaje externo del jugo pancreático. La radiactividad recuperada en este fluido fue muy baja en relación a la administrada y la mayor proporción correspondió al estrógeno. Por otra parte, no pudo demostrarse conjugación de esteroides libres "in vivo" ni en homogenados libres de células de tejido pancreático (3).

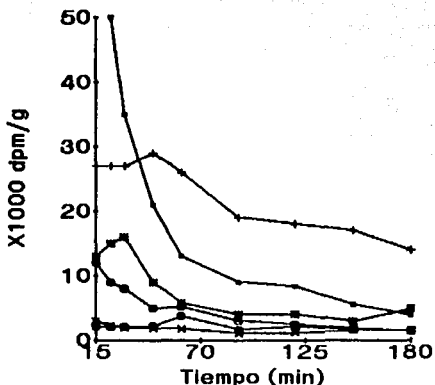


Fig. 1. Gráfico de distribución de radiactividad en varias muestras de tejido de perro macho después de la administración endovenosa de 100 μ Ci 3 H6,7-estriol.

(●) Hígado (+) Pancreás (*) Riñón
 (○) Próstata (x) Músculo (●) Testículo

Se han descrito receptores y/o proteínas ligadoras para estrógenos en el citosol, núcleo y microsomas de las células acinares del páncreas en varias especies de mamíferos incluyendo la humana; en glándulas submaxilares y próstata también se localizan estas proteínas. Es interesante hacer notar que las glándulas submaxilares, la próstata y el páncreas están embriológicamente relacionados (4-6). En estudios recientes, se encontraron niveles elevados de receptores de alta afinidad para estrógenos en las

elevados de receptores de alta afinidad para estrógenos en las fracciones nuclear y citosólica del tejido pancreático fetal humano y en tejido pancreático adulto con carcinoma, pero no así en páncreas adulto normal (7). La presencia de niveles altos de receptores específicos en el cáncer de páncreas sugiere, por analogía con lo estudiado en el carcinoma de glándula mamaria, que el crecimiento del tumor de páncreas puede ser dependiente de estrógenos. En relación a la patología del páncreas es interesante mencionar que las alteraciones relacionadas con la función pancreática como pancreatitis e hiperlipidemia, han sido descritas en pacientes que reciben tratamiento con estrógenos, incluyendo anticonceptivos hormonales (8-11).

Estudios sobre carcinogénesis experimental señalan la participación de la testosterona como promotor en la inducción de tumores pancreáticos en ratas, después de la administración de 4-hidroxi-aminoquinolina-1-óxido (HAQO). La HAQO es un carcinógeno sintético que induce la formación de adenomas exócrinos en el páncreas de la rata. El índice de tumores pancreáticos en ratas tratadas con HAQO es significativamente mayor en ratas macho (8/12) que en ratas hembra (1/11); la castración disminuye la incidencia de tumores pancreáticos (0/11 en el macho y 0/13 en la hembra), en tanto que la administración de testosterona después de la castración incrementa la incidencia de tumores pancreáticos en ambos sexos (6/12 en el macho y 5/11 en la hembra) [Tabla I] (12).

TABLA I

EFFECTO DE LA CASTRACION Y LA TESTOSTERONA SOBRE LA
INDUCCION DE TUMORES PANCREATICOS EN RATAS POR LA HAQO.

		tratamiento			ratas	tumores
sexo	grupo	HAQO	Castrac.	Test.	examinadas	pancreáticos
	control	-	-	-	30	0
	1m	si	-	-	12	8
macho	2m	si	si	-	11	0
	3m	si	si	si	11	6
	control	-	-	-	30	0
	1h	si	-	-	11	1
hembra	2h	si	si	-	13	0
	3h	si	si	si	10	5

En relación a la patología humana es importante mencionar que la incidencia del carcinoma de páncreas es mucho mas elevado en el hombre que en la mujer (13). Así mismo, alteraciones en el perfil sérico de andrógenos, consistentemente niveles bajos de testosterona se han correlacionado con la presencia de carcinoma de páncreas en los varones (14,15).

Estudios recientes demostraron la actividad de dos enzimas biosintéticas de hormonas esteroides: la aromatasa y la 5 α -reductasa en tejido de páncreas adulto normal, con carcinoma y fetal. La aromatasa es una enzima que cataliza la conversión de hormonas esteroides C $_{19}$ (testosterona y androstendiona en esteroides C $_{18}$ (estradiol y estrona). Esta enzima está usualmente asociad con la

presencia de receptores para estrógenos; la actividad de esta enzima en el tejido fetal y con carcinoma es comparable con la reportada en al endometrio, mientras que la actividad del páncreas normal fue significativamente menor. Así mismo, se determinó la actividad de la 5 α -reductasa, la enzima cataliza la conversión de testosterona a 5 α -dihidrotestosterona, el cual es el derivado androgénico más potente en algunos tejidos. La actividad se determinó en los mismos tejidos; en el páncreas normal y fetal es significativa, pero menor que en páncreas con carcinoma; estos resultados fueron comparados con los reportados en la próstata [Tabla II] (16).

TABLA II
 ACTIVIDAD DE AROMATASA Y 5 α -REDUCTASA EN
DIFERENTES TEJIDOS EXAMINADOS.

Aromatasa			
(pmol de E ₂ formado/60 min por mg de proteína)			
	páncreas	carcinoma	útero
	fetal	normal	pancreático (control)
	9.25	1.73	12.30
			11.30
5 α -Reductasa			
(pmol de DHT formado/60 min por mg de proteína)			
	páncreas	carcinoma	próstata
	fetal	normal	pancreático (control)
	50	56.3	105.3
			236.6

No obstante, pocos estudios se han llevado a cabo y es poca la información relacionada a la biosíntesis y transformación de hormonas esteroides la glándula pancreática. En base a lo anterior, surge el interés de nosotros en estudiar las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de hormonas esteroides en el páncreas. Recientemente, reportamos la presencia de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa la cual se localiza en la fracción mitocondrial del páncreas canino y es dependiente de NAD(H). La enzima cataliza la oxidorreducción entre androstendiona-testosterona, y estradiol-estrona. Las constantes cinéticas calculadas para la enzima pancreática con androstendiona y testosterona como substratos, son del mismo orden de magnitud que las reportadas para la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de testículo de cerdo, rata y humano, la cual está involucrada fisiológicamente en la biosíntesis de testosterona (17). Actualmente, la continuación de nuestros estudios nos ha permitido identificar e iniciar la caracterización del complejo enzimático Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - 4 -isomerasa en el páncreas de perro. La enzima es dependiente de nucleótidos de piridina, el complejo cataliza la conversión de esteroides C_{19} y C_{21} Δ^5 - 3β a su correspondiente Δ^4 -3-cetoesteroides. La conversión de estos compuestos involucra la secuencia de dos pasos enzimáticos: la deshidrogenación, mediada por la 3β -hidroxiesteroide:NAD(P) oxidoreductasa (E.C.1.1.1.51) y la isomerización mediada por la 3-cetoesteroide Δ^4 , Δ^5 -oxidoreductasa

(E.C.5.3.3.1). La participación de este sistema enzimático es esencial en la biosíntesis de esteroides biológicamente activos.

OBJETIVOS

1.- Estudiar las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroides en el tejido pancreático. Particularmente, se estudiará el sistema enzimático Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) y la 3-cetoesteroide Δ^4 , Δ^5 -oxidoreductasa (EC 5.3.3.1) de páncreas canino.

2.- Establecer su localización subcelular.

3.- Establecer sus constantes cinéticas, especificidad por el sustrato, requerimiento de co-sustrato y condiciones de ensayo.

4.- Estudiar la regulación de las enzimas esteroideogénicas del páncreas, particularmente la influencia de hormonas esteroides sobre la actividad de esta enzima.

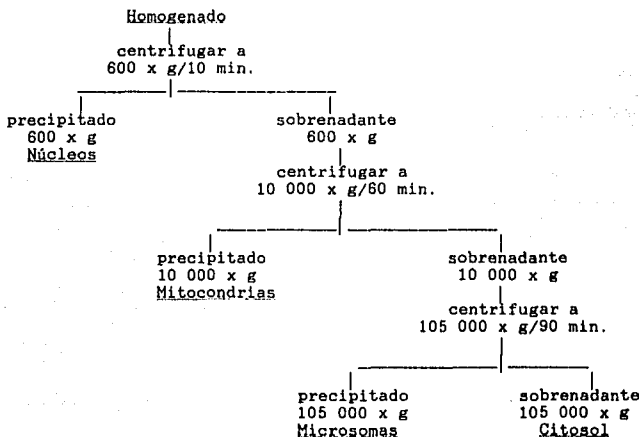
METODOLOGIA

Preparación de tejido:

Los páncreas de perros machos mestizos, fueron donados por el Instituto Nacional de Cardiología. El homogenado, las mitocondrias, los microsomas y el citosol se obtuvieron por centrifugación diferencial inmediatamente después de haber obtenido el tejido (18). El medio de aislamiento para las fracciones contiene: fosfato

de potasio dibásico 5.0 mM, EDTA 1.0 mM, 2 β -mercaptoetanol 7.0 mM, cloruro de magnesio 5.0 mM, PMSF 0.5 mM y azida de sodio 0.02%, ajustado a pH 7.2. El aislamiento se llevo a cabo a 4°C. Las fracciones subcelulares se almacenaron a -20°C hasta el momento de hacer las incubaciones.

Diagrama de flujo de la centrifugación diferencial.



Ensayo enzimático:

La actividad de la Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se determinó cuantificando la conversión de pregnenolona a proges-

terona, así como de dehidroepiandrosterona a androstendiona. La mezcla de ensayo contenía en un volumen total de 1.0 ml: 50 nmoles de sustrato esteroidal disueltos en 0.05 ml de etanol al 95%, NAD⁺ 1.5 mM, amortiguador de fosfato de potasio pH 7.2 y cantidades apropiadas de enzima. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a 37°C por 10 min con agitación constante. La reacción se detuvo por la adición de 10 ml de éter etílico seguidos de una agitación vigorosa. La extracción etérea se realizó en dos ciclos, el extracto fue evaporado a sequedad; el residuo final fue disuelto en etanol y posteriormente se sometió a cromatografía de capa fina en un sistema de solventes de cloroformo:acetona (90:8, v/v). Las áreas correspondientes a progesterona y androstendiona fueron detectadas por luz ultravioleta a 254 nm y las correspondientes a pregnenolona y dehidroepiandrosterona se detectaron rociando la hoja con ácido sulfúrico:etanol (5:95, v/v) y calentando de 5-7 min a 110°C. La sílica gel que contenía los compuestos identificados fue transferida a viales de centelleo y la radiactividad se cuantificó en 10.0 ml de solución de tolueno:triton X-100 (2:1, v/v), que contenía 0.5% de PPO y 0.05% de dimetil POPOP. La cantidad de producto fue expresada en nmoles dividiendo la radiactividad recuperada entre la radiactividad específica del sustrato inicial.

La actividad de la 5α - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa para pregnenolona fue expresada como nmoles de progesterona formada por mg de proteína por minuto y la actividad de la enzima para dehidroepiandrosterona como nmoles de androstendiona

producida por mg de proteína por minuto.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et. al. con albúmina sérica bovina como patrón (19). Los datos cinéticos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten y los parámetros correspondientes calculados de acuerdo a Wilkinson (20).

RESULTADOS

Localización subcelular:

La distribución subcelular de la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa de páncreas canino se puede observar en la Tabla III, la cual es un resumen representativo de los resultados. Cada fracción subcelular obtenida por centrifugación diferencial fue incubada con pregnenolona o dehidroepiandrosterona como sustrato y NAD^+ bajo las condiciones de ensayo descritas en la metodología. Para ambos sustratos esteroides, más del 70% de la actividad de la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa, se concentró en la fracción mitocondrial con el correspondiente incremento en la actividad específica enzimática. Una actividad remanente fue localizada en la fracción microsomal y en el sedimento particulado a $600 \times g$ (núcleos y debris).

La preparación pancreática mitocondrial que es utilizada como fuente de la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa, puede ser almacenada a -20°C al menos durante dos meses con una pequeña pérdida (10%) de la actividad enzimática.

TABLA III

DISTRIBUCION INTRACELULAR DE LA ACTIVIDAD DE LA α -3 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA-ISOMERASA EN TEJIDO PANCREATICO CANINO

Fracción Subcelular	Proteína mg/ml	Volumen ml	Substrato: Pregnenolona		
			Actividad específica (nmol/min/mg)	Actividad total (umol/min)	Actividad recuperada (%)
Homogenado	13.5	480.0	0.394	2.562	100.0
Núcleo	11.3	52.0	0.186	0.109	4.3
Mitocondrias	24.3	100.0	0.753	1.833	71.5
Microsomas	36.0	16.0	0.384	0.222	8.6
Citosol	5.0	357.0	0.003	0.005	0.2

Fracción Subcelular	Proteína mg/ml	Volumen ml	Substrato: Dehidroepiandrosterona		
			Actividad específica (nmol/min/mg)	Actividad total (umol/min)	Actividad recuperada (%)
Homogenado	13.5	480.0	0.267	1.736	100.0
Núcleo	11.3	52.0	0.231	0.136	7.8
Mitocondrias	24.3	100.0	0.554	1.349	77.7
Microsomas	36.0	16.0	0.260	0.150	8.6
Citosol	5.0	357.0	0.000	0.000	0.0

Identificación de los productos

La bioconversión de pregnenolona y dehidroepiandrosterona se llevo a cabo en homogenados de tejido pancreático en presencia de NAD⁺ o NADP⁺ y se cuntificó la cantidad de metabolitos radiactivos producidos después de un periodo de 30 min de incubación. Un solo

producto se formó a partir de pregnenolona en presencia de NAD^+ o NADP^+ . Este compuesto comigra con progesterona, y por su recristalización con progesterona cristalina mostró ser 96% puro. Así mismo, androstendiona fue el único metabolito formado a partir de dehidroepiandrosterona y NAD^+ o NADP^+ . La recristalización con androstendiona pura indica que el producto formado esta sobre el 95% de pureza. La radiactividad recuperada como pregnenolona y progesterona, así como dehidroepiandrosterona y androstendiona, en cromatografía de capa fina tiene un promedio de 92.7 y 95.6%, respectivamente. Ningún compuesto radiactivo detectable se formó cuando se usó homogenado de páncreas de perro desnaturalizado por calor.

Especificidad del co-substrato

La N^5 - 3β -hidroxoesteroide deshidrogenasa-isomerasa, es una enzima dependiente de nucleótidos de piridina. La enzima demostró tener una especificidad dual, tanto NAD^+ como NADP^+ pueden servir como aceptores de electrones en la reacción catalizada por la enzima. Sin embargo, el NAD^+ es el nucleótido preferido durante la oxidación de ambos substratos esteroidales. Cuando pregnenolona o dehidroepiandrosterona se incubaron en presencia de NADP^+ a una concentración de 0.2 mM, la cantidad de progesterona o androstendiona producida fue solo el 3 y 23 %, respectivamente, de la obtenida en presencia de una concentración equimolar de NAD^+ . El

efecto del incremento en las concentraciones de NAD^+ ($0.5\text{-}200\ \mu\text{M}$) o NADP^+ ($0.1\text{-}15.0\ \text{mM}$) se puede observar en la [Fig. 2]. Con una alta concentración de pregnenolona ($80\ \mu\text{M}$), la constante de Michaelis (K_m) aparente para el NAD^+ y el NADP^+ fue de $9.61 \pm 0.78\ \mu\text{M}$ y $2.44 \pm 0.22\ \text{mM}$, respectivamente. Usando dehidroepiandrosterona como sustrato el valor de la K_m aparente para el NAD^+ fue de $9.63 \pm 1.64\ \mu\text{M}$ y para el NADP^+ fue de $0.23 \pm 0.03\ \text{mM}$. Como se pudo observar, en presencia de NAD^+ , la enzima pancreática mostró una velocidad de oxidación mayor para pregnenolona, mientras que, cuando el NADP^+ fue utilizado como co-sustrato una oxidación preferencial para DHA pudo ser observada. En ausencia de NAD^+ o NADP^+ durante el periodo de incubación, no se observa una cantidad significativa de producto formado.

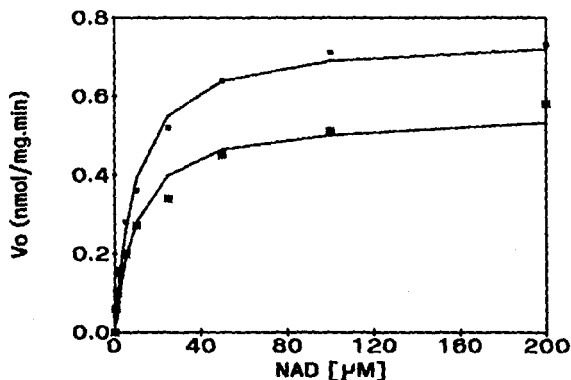
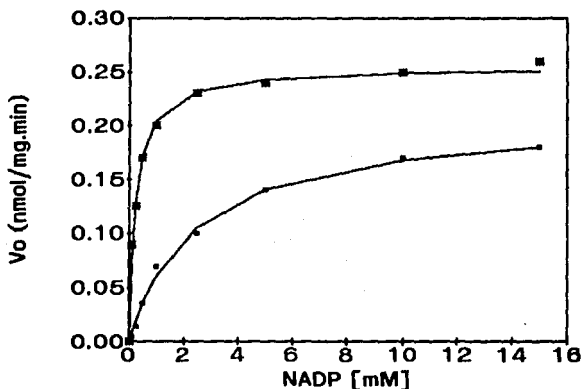


Fig. 2. Efecto del incremento en las concentraciones de (a) NAD^+ y (b) NADP^+ en la actividad de la 3 β HSD mitocondrial. (•-•) progesterona formada, (*-*) androstendiona formada.



Efecto de la concentración de proteína y el tiempo de incubación

La cantidad de progesterona o androstendiona formada a partir de su correspondiente substrato, incrementa proporcionalmente cuando se aumenta la concentración de proteína hasta 1.0 mg/ml, [Fig. 3a]. A una concentración fija de proteína (1.0 mg), se puede observar una relación lineal entre el tiempo de incubación y la velocidad de formación de los productos, hasta los 10 min [Fig. 3b].

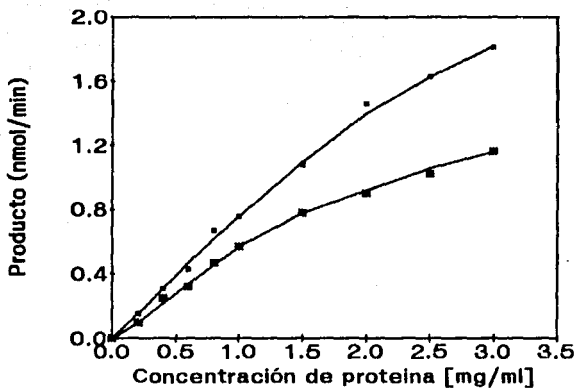
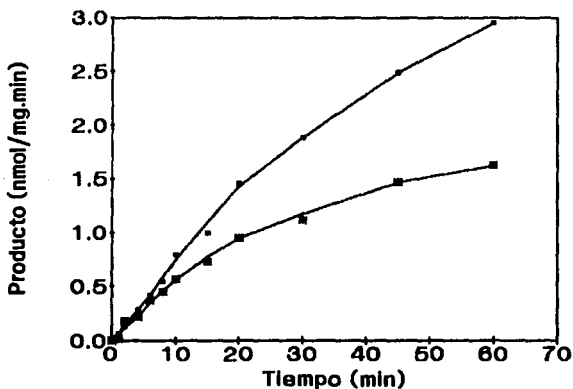


Fig. 3(a). Efecto de la concentración de proteína de la preparación mitocondrial en la síntesis de progesterona y androstendiona. 3(b). Formación de productos con respecto al tiempo de incubación. (■ - ■) progesterona formada, (* - *) androstendiona formada.



Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática

El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática se puede observar en las Figuras 4a y 4b respectivamente. El efecto del pH sobre la actividad de la 5α - 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa-isomerasa pancreática, para con ambos sustratos, pregnenolona y dehidroepiandrosterona, fue examinado en un intervalo de pH 5.0 a 12.0, utilizando tres sistemas de amortiguadores: 0.2 M de acetato de sodio, pH de 5.0 a 6.0; 0.2 M de tris-HCl, pH de 6.5 a 9.0; y 0.2 M de glicilglicina-NaOH y pH de 9.5 a 12.0. El pH óptimo de la enzima utilizando como sustrato pregnenolona es de 8.0, mientras que, con dehidroepiandrosterona como sustrato, la actividad enzimática se extendió en forma de meseta al incrementarse el pH entre 8.0 y 9.5. La reacción de la enzima para pregnenolona procede a la misma velocidad que para dehidroepiandrosterona a un pH alrededor de 9.0. Cuando el pH se incrementa por arriba de 9.0, se puede observar una velocidad mayor de reacción para dehidroepiandrosterona.

Las velocidades iniciales de la reacción de la enzima fueron determinadas a temperaturas de incubación entre 20 y 60 °C, bajo las mismas condiciones de ensayo. La actividad de la enzima para ambos sustratos esteroidales incrementa al elevar la temperatura hasta 45°C; a temperaturas superiores la actividad decrece rápidamente, hasta no observarse más la conversión enzimática.

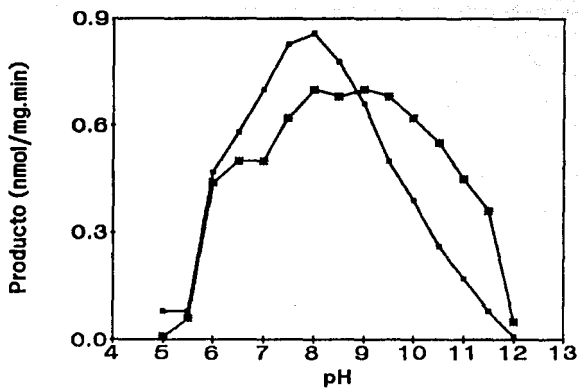
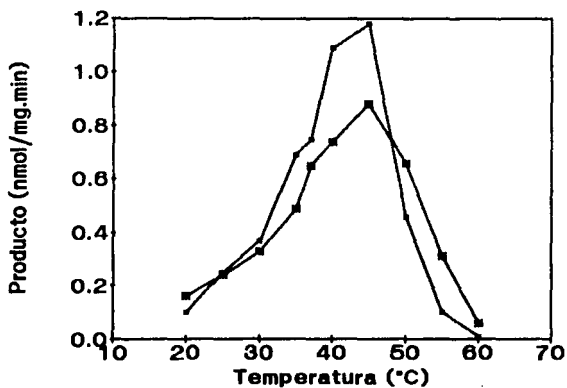


Fig. 4. Actividad de la 3βHSD en función de: (a) pH y (b) temperatura (■-■) progesterona formada, (*-*) androstendiona formada.



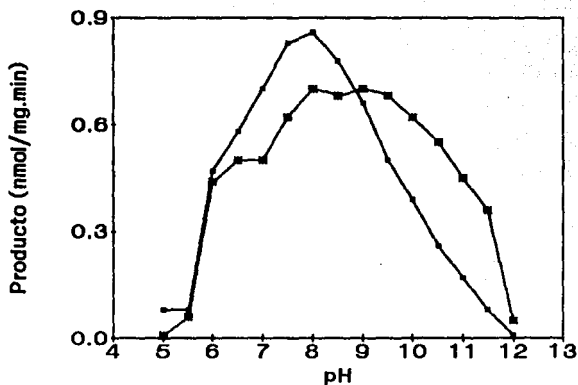
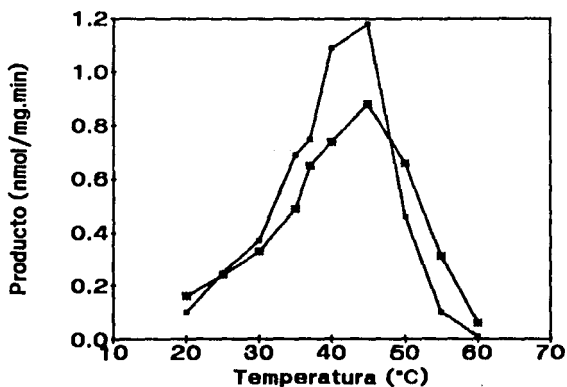


Fig. 4. Actividad de la 3βHSD en función de: (a) pH y (b) temperatura (■-■) progesterona formada, (*-*) androstendiona formada.



Cinética de la saturación del sustrato

Ya una vez establecidas las condiciones de ensayo, se determinaron las constantes cinéticas de algunos sustratos, así como, el efecto de otros esteroides sobre la conversión de pregnenolona y dehidroepiandrosterona a sus respectivos productos.

El resultado del incremento en las concentraciones de pregnenolona y dehidroepiandrosterona en un intervalo de 0.5 a 80 μM , incubados separadamente, sobre la velocidad inicial de la 17β -3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa-isomerasa mitocondrial pancreática se puede observar en la Fig. 5.

La constante de Michaelis (K_m) aparente para pregnenolona a una concentración fija de NAD^+ (10 veces la K_m) fue $6.54 \pm 0.72 \mu\text{M}$ a pH 7.0 y 37 °C. Usando dehidroepiandrosterona como sustrato, la K_m aparente fue de $3.3 \pm 0.23 \mu\text{M}$, calculada bajo las mismas condiciones. Las actividades específicas para pregnenolona y dehidroepiandrosterona, fueron 0.82 ± 0.02 y 0.62 ± 0.01 nmol/min.mg, respectivamente.

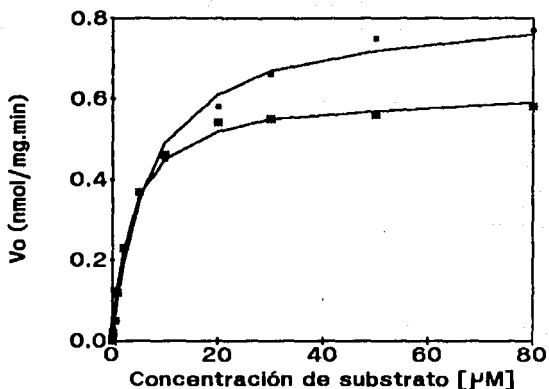


Fig. 5. Gráfico directo de las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato. (■-■) progesterona formada, (*-*) androstendiona formada.

La tabla IV es un resumen del efecto de varios esteroides sobre la actividad de la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa en presencia de pregnenolona o dehidroepiandrosterona, incubados separadamente. La concentración final de cada uno de los esteroides utilizados es de $100 \mu\text{M}$ para pregnenolona y $50 \mu\text{M}$ para dehidroepiandrosterona.

TABLA IV

EFFECTO DE VARIOS ESTEROIDES SOBRE LA CONVERSION DE PREGNENOLONA Y DEHIDROEPIANDROSTERONA A PROGESTERONA Y ANDROSTENDIONA RESPECTIVAMENTE

	% de Actividad Remanente	
	<u>Pregnenolona</u>	<u>Dehidroepiandrosterona</u>
Control	100.00	100.00
17 β -estradiol	10.05	59.07
Testosterona	11.98	79.62
20 α -dihidroprogesterona	12.45	66.97
Estrona	12.49	63.38
Epiandrosterona	13.72	65.88
Desoxicorticosterona	23.60	45.47
Pregnenolona		14.65
Dehidroepiandrosterona	6.60	
Progesterona	10.08	54.71
Androstendiona	14.18	84.2

DISCUSION

La Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa es una enzima que cataliza la conversión de esteroides C₁₉ y C₂₁ Δ^5 -3 β a su correspondiente Δ^4 -3-cetoesteroides. La conversión de estos compuestos involucra la secuencia de dos pasos enzimáticos: la deshidrogenación, mediada por la 3 β -hidroxiesteroide:NAD(P) oxido-reductasa (E.C.1.1.1.51) y la isomerización mediada por la 3-cetoesteroide Δ^4 , Δ^5 -oxidoreductasa (E.C.5.3.3.1). En esta secuencia de pasos enzimáticos, la deshidrogenación es la reacción inicial y paso limitante, ya que la relación de la velocidad de reacción de la deshidrogenasa con respecto a la isomerasa es 1 a 14. En otros estudios reportan que la velocidad de reacción de la isomerasa es 10 veces mayor que la deshidrogenación (21,26-28).

La 3 β HSD se localiza en la fracción mitocondrial aunque actividad remanente se localiza en los microsomas. La enzima ha sido estudiada principalmente en testículo, suprarrenales y placenta humana, y usualmente esta asociada a los microsomas, como en el caso de testículos y suprarrenales; pero en placenta se localiza por igual en mitocondrias y microsomas. Las actividades de aromatasa y 5 α -reductasa se midieron en el homogenado libre de células, mientras que la 17 β HSD se localiza principalmente en la fracción mitocondrial (21-25).

La 3 β HSD pancreática de perro se asemeja a otras deshidrogenasas de otros órganos esteroidogénicos en la especificidad por el nucleótido y el requerimiento de NAD⁺ para la máxima actividad. Los valores de Km reportados en este estudio para los co-substratos son similares a los reportados, para esta enzima, en placenta humana, testículos humanos y suprarrenales de rata. Las constantes cinéticas para los substratos esteroidales obtenidas en este trabajo son del mismo orden de magnitud que los reportados para otros órganos esteroidogénicos, la tabla V es un resumen comparativo de estos resultados. Como se puede observar los valores obtenidos para todos los tejidos son aproximadamente del mismo orden de magnitud; para pregnenolona fluctúan en un intervalo de 0.52 a 10.0 μ M, y para dehidroepiandrosterona de 0.15 a 3.30 μ M (26-30).

Las enzimas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroides de tejido pancreático son: la aromatasa, la cual cataliza la conversión de testosterona y androstendiona en estradiol y

estrona respectivamente; la 5α -reductasa, la cual cataliza la conversión de testosterona en 5α -dihidrotestosterona. Ambas enzimas fueron localizadas en tejido pancreático humano de adulto normal, con carcinoma y fetal. Las actividades de ambas enzimas fueron mayores en el tejido con carcinoma y fetal (17). Otra enzima identificada en el páncreas es la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β HSD), la enzima cataliza la oxidirreducción entre testosterona-androstendiona y estradiol-estrona (18). Por último, la 17β - 17α -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa la cual es esencial en la biosíntesis de hormonas esteroideas biológicamente activos. La presencia de varias enzimas biosintéticas que participan en el metabolismo de hormonas esteroideas presentes en el tejido pancreático nos permiten suponer alguna participación de esta glándula en dicha función, así como, presentar una posible vía metabólica (Esquema 1).

El estudio de las vías metabólicas comprende las propiedades de las enzimas involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Algunas de las propiedades de estas enzimas en tejidos esteroideogénicos es que están reguladas por los mismos esteroideos. En este estudio se reportan datos que permiten ver el efecto de algunos esteroideos sobre la actividad de la 3β HSD, y la mayor parte de los esteroideos mencionados inhiben la actividad de la enzima. Para poder obtener más conocimiento acerca de la regulación de una vía, es necesario considerar la relación de los valores de K_m de la enzima por el sustrato, el valor de K_i para el esteroide regulador y la concentración endógena de ambos esteroideos (sustrato y regulador).

Esta reacción ha sido estudiada en otros tejidos esteroideogénicos. En la tabla VI se muestra un resumen comparativo de algunos esteroides que tienen un efecto inhibitorio en la síntesis de progesterona y androstendiona a partir de pregnenolona y dehidroepiandrosterona respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por otros investigadores (28).

Recientemente se ha reportado la purificación de la enzima ha homogeneidad en placenta humana, testículos de rata y suprarrenales de rata macho; la preparación final de la enzima para todos los casos contiene ambas actividades y en geles de poliacrilamida SDS aparece una sola banda. Los pesos moleculares reportados para esta enzima varían de 19000 a 47000 en geles de poliacrilamida-SDS y de 76000 a 91000 usando filtración en gel (27,31-33). En otros organismos, como en la bacteria Pseudomona testosteroni la deshidrogenación y la isomerización se llevan a cabo por dos enzimas separadas que ya han sido purificadas y ampliamente estudiadas (34).

El propósito de este proyecto es continuar con la purificación de la enzima a homogeneidad y alternadamente trabajar con tejido pancreático humano. La identificación y caracterización de las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de hormonas esteroides, son de gran importancia en el conocimiento de la fisiología y patología pancreática, y pueden proporcionar información útil, particularmente, para el diagnóstico y tratamiento del cancer de páncreas (35-36).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Grossman A., Boctor A.M. and Lane B. (1969) *Endocrinology* 85, 956-959.
- 2.- Ulberg S. and Bengtsson A.A. (1978) *Acta endocrinol. Copenh.* 43 75-86.
- 3.- Kirdani R.Y., Varkarakis R.J., Murphy G.P. and Sandberg A.A. (1972) *Endocrinology* 90, 1245-1251.
- 4.- Rosenthal H.E. and Sandberg A.A. (1978) *J. Steroid Biochem.* 9, 1113-1139.
- 5.- Sandberg A.A. and Rosenthal H.E. (1979) *J. Steroid Biochem.* 11, 293-299.
- 6.- Pousette A., Fernstad R., Theve N.O., Skoldfors H. and Carlstrom K. (1985) *J. steroid Biochem.* 23, 115-119.
- 7.- Greenway B., Iqbal M.J., Johnson P.J. and Williams R. (1981) *Br. Med. Journal* 283, 751-753.
- 8.- Davidoff F., Tishler S. and Rosoff C. (1973) *New Engl. J. Med.* 289, 552-555.
- 9.- Glueck C.J., Sheel D., Fishback J. and Steiner P. (1972) *Metabolism* 21, 657-666.
- 10.- Greenberger N.J., Hatch F.T., Drummey G.D. and Isselbacher K.J. (1966) *Medicine, Baltimore* 45, 161-174.
- 11.- Waddell, W.R. (1973) *Surgery* 74, 420-429.
- 12.- Hayashi Y. and Katayama H. (1981) *Toxicol. Lett.* 9, 349-354.
- 13.- Levin D.L., Connelly R.R. and Deveja S.S. (1981) *Cancer* 47, 1456-1468.
- 14.- Greenway B., Iqbal M.J., Johnson P.J. and Williams R. (1983) *Br. Med. J.* 286, 93-95.
- 15.- McColl K.E.L. (1983) *Br. Med. J.* 286, 641-642.
- 16.- Iqbal M.J., Greenway B., Wilkinson M.L., Johnson P.J. and Williams (1983) *Clin. Sci.* 65, 71-75.

- 17.- Mendoza-Hernández G., López-Solache I., Rendón J.L., Díaz-Sánchez V. and Díaz-Zagoya J.C. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 376-382.
- 18.- A.M. Tartakoff and J.D. Jamieson. (1974) *Methods in Enzymology* XXXI, 41-59. S. Fleischer and L. Parker, Ed. Academic Press, N.Y.
- 19.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. biol. Chem.* 193, 265-275.
- 20.- Wilkinson, G.N. (1961) *Biochem J.* 80, 324-332.
- 21.- Rabe T., Brandstetter K., Kellermann J. and Runnebaum B. (1982) *J. steroid Biochem.* 17, 427-433.
- 22.- Tamaoki B.I. (1973) *J. steroid Biochem.* 4, 89-118.
- 23.- Ferre F., Breullier M., Cedard L., Duchesne M.J., Saintot M., Descomps B. and Crastes de P. A. (1975) *Steroids* 26, 551-570.
- 24.- Moustafa M.A. and Koritz B.S. (1975) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 149, 823-825.
- 25.- Basch S.R. and Finegold J.M. (1971) *Biochem. J.* 125, 983-989.
- 26.- Byrne, G.C., Perry Y.S. and Winter J.S.D. (1986) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 413-418.
- 27.- Thomas L.J., Berko A.E., Faustino A., Myers P.R. and Strickler C.R. (1988) *J. steroid Biochem.* 31, 785-793.
- 28.- Gower D.B. and Cooke G.M. (1983) *J. steroid Biochem.* 19, 1527-1556.
- 29.- Díaz-Zagoya, J.C. and Arias, F. (1981) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 637-640.
- 30.- Fan D.F. and Troen P. (1975) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 563-574.
- 31.- Ishi-Ohba H., Inano H. and Tamaoki B.I. (1986) *J. steroid Biochem.* 25, 555-560.
- 32.- Ishi-Ohba H., Saiki N., Inano H. and Tamaoki B.I. (1986) *J. steroid Biochem.* 24, 753-760.
- 33.- Ford C.H. and Engel L.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1363-1368.

- 34.- Batzold F.H., Benson M.A., Covey F.D., Robinson C.H. and Talalay P. (1976) Adv. Enz. Regul. 14, 243-267.
- 35.- Shearer M.G., Taggart D., Gray C. and Imrie C.W. (1984) Digestion 30, 106-107.
- 36.- Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V., Méndez J.P., Altamirano A. and Wolpert E. (1987) Pancreas 2, 684-687.

TABLA V
RESUMEN COMPARATIVO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS PARA
LOS SUBSTRATOS ESTEROIDALES

	Pregnenolona		Dehidroepiandrosterona		(ref)
	Km (μ M)	Vmax (nmoles/mg. min)	Km (μ M)	Vmax (nmoles/mg. min)	
PANCREAS (canino [*])	6.54	0.62	3.30	0.62	
PLACENTA (humana ^o)	1.90	32.6	2.80	32.0	(27)
ADRENAL (humano ^o)	0.52		0.31		(26)
PLACENTA (humana [*])		0.18			(29)
PLACENTA (humana ⁺)			0.33		(28)
TESTICULO (humano [*])			0.82		(28)
TESTICULO (humano [*])	10.0		2.50		(28)

- * Mitocondrias
- ^o Microsomas
- ⁺ Homogenado
- * Sobrenadante postmitocondrial

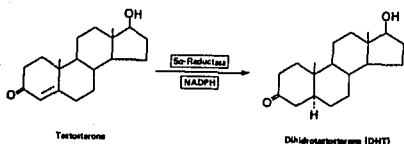
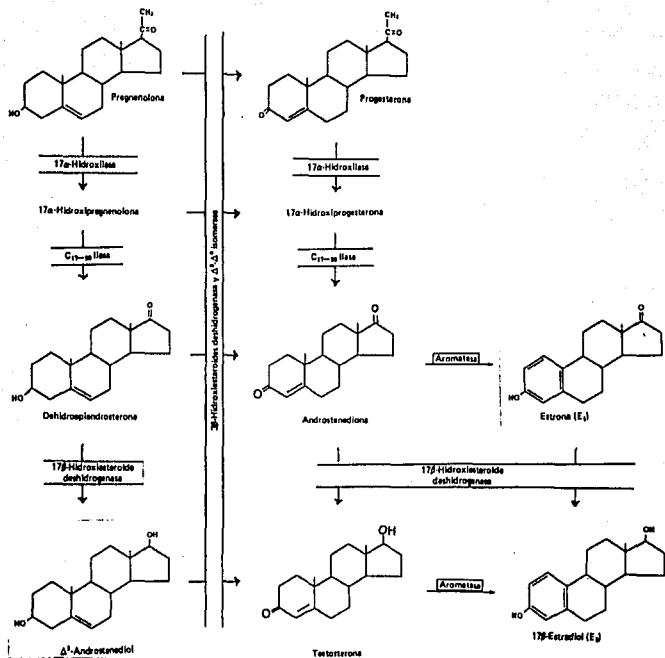


TABLA VI

EFEECTO INHIBITORIO DE ALGUNOS ESTEROIDES EN LA SINTESIS
DE PROGESTERONA Y ANDROSTENDIONA EN DIFERENTES TEJIDOS

Reacción	Adrenales	Placenta	Tejidos Testículos	Páncreas
Pregnenolona Progesterona	Testosterona Progesterona Androstendiona	20 α -dhprogesterona Progesterona DHA Estrona Cortisona	20 α -dhprogesterona Progesterona DHA Estradiol Estrona 17 α -pregnenolona	20 α -dhprogesterona Progesterona DHA Estradiol Testosterona Androstendiona
DHA Androstendiona	Androstendiona Estradiol Estrona 5 α -DHT	Androstendiona Pregnenolona Progesterona Testosterona 20 α -dhprogesterona	Androstendiona Estradiol Androstendiol	Androstendiona Estradiol Progesterona Testosterona

ABREVIATURAS

3 β HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa.
17 β HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
Pregnenolona: 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona.
Progesterona: 4-pregnene-3,20-diona.
Dehidroepiandrosterona, (DHA): 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona.
Testosterona: 17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona.
Androstendiona: 4-androsten-3,17-diona.
Estradiol: 1,3,5(10)-oestratrien-3,17 β -diol.
Estrona: 3-hidroxi-1,3,5(10)-oestratrien-17-ona.
Estriol: 1,3,5(10)-oestratrien-3,16 α ,17 β -triol.
5 α -dihidrotestosterona, (DHT): 17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona.
Androstendiol: 5-androstene-3 β -17 β -diol.
20 α -dhprogesterona: 20 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona.
17 α -pregnenolona: 3 β ,17 α -dihidroxi-5-pregnen-20-ona.
HAQO: 4-hidroxi-aminoquinolina 1-oxido.
EDTA: etilen diamina N,N,N',N'-ácido tetraacético.
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro.
PPO: 2,5-difeniloxazole
Dimetil POPOP: (1,4-bis-[4-metil-5-fenil-2oxazolil]senceno)

ANEXO

17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY IN CANINE PANCREAS

G. Mendoza-Hernández, I. López-Solache, J. L. Rendón, V. Díaz-Sánchez and
J. C. Díaz-Zagoya

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad
Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, 04510,
México, D. F., MEXICO

Received February 19, 1988

Summary: The mitochondrial fraction of the dog pancreas showed NAD(H)-dependent enzyme activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. The enzyme catalyzes oxidoreduction between androstenedione and testosterone. The apparent K_m value of the enzyme for androstenedione was $9.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$, the apparent V_{max} was determined as $0.4 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and the optimal pH was 6.5. In phosphate buffer, pH 7.0, maximal rate of androstenedione reduction was observed at 37°C. The oxidation of testosterone by the enzyme proceeded at the same rate as the reduction of the androstenedione at a pH of 6.8-7.0. The apparent K_m value and the optimal pH of the enzyme for testosterone were $3.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ and 7.5, respectively. © 1988 Academic Press, Inc.

Over the last few years a number of interesting observations have provided evidence suggesting the involvement of the pancreas in the biosynthesis and metabolism of steroid hormones. Estrogen binding globulins and steroid receptors have been reported in normal and malignant pancreatic tissue (1-4). Aromatase and 5 α -reductase activity has been measured in cell-free homogenates of human pancreatic tissue (5). Several changes in the serum androgen profile, mainly low testosterone levels, have been found to be related to human pancreatic carcinoma (6-8), and recent studies on experimental pancreatic carcinoma in rat suggested that this tumor could be hormone-responsive (9,10). Despite the importance of steroid metabolism in the pancreas, few studies have been performed and little information on the pancreas ability to synthesize steroids is available.

To obtain more information on the steroidal functions of the pancreas, it appeared of interest to study the enzymatic activ-

Abbreviations: EDTA, ethylene diamine N,N,N',N'-tetraacetic acid; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; (SE), standard error; androstenedione, androst-4-ene-3,17-dione; testosterone, 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one.

ities involved in the metabolic transformations of steroid hormones in this gland. The present paper reports an active 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the mitochondrial fraction of the dog pancreas, which catalyzes oxidoreduction between androstenedione and testosterone. This finding supports the hypothesis that the pancreas could be an extragonadal site of steroid hormone metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. [1,2-³H]Androstenedione (specific activity, 46.1 Ci/nmol) and [1,2-³H]testosterone (specific activity, 49.0 Ci/nmol) were purchased from New England Nuclear Corp. (Boston, Mass.), and rechromatographed on a Sephadex LH-20 column, equilibrated and developed with the solvent system toluene:methanol (85:15, v/v). The radioactive purity of the steroids was confirmed by thin-layer chromatography in a system of methylene dichloride:ethyl acetate (80:20, v/v) prior to use. The radioactive steroids were diluted with the corresponding authentic non-radioactive steroids purchased from Steraloids Inc. (Wilton, N.H.) to obtain appropriate specific radioactivity for the enzyme assays.

Pyridine nucleotides (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH), PMSF and 2-mercaptoethanol were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), thin-layer chromatography sheets and analytical-grade solvents were obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). All the chemical reagents used were of analytical grade. Deionized water was used for all aqueous solutions.

Tissue preparation. Pancreas of male mongrel dogs were obtained from the Instituto Nacional de Cardiología (México, D. F.). After transportation in ice to the laboratory, tissues were dissected away from obvious fat and connective tissue, weighed, minced with scissors, and homogenized in ice-cold 0.25 M sucrose solution containing 0.05 M potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 μ M PMSF, and 7 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0, with a weight/volume ratio of 1:10. Homogenization was performed in a Polytron apparatus with three 20 sec bursts at 3000 rpm. Subcellular fractions were prepared by differential centrifugation (11). All operations were conducted at 0-4°C. The homogenate was subjected to a 600 x g, 10-min centrifugation to eliminate nuclei, unbroken cells, and heavy debris. The resulting supernatant was centrifuged at 1000 x g for 10 min to sediment the zymogen granules. The mitochondrial fraction was sedimented by centrifugation for 15 min at 8700 x g. The pellet was washed three times with homogenization buffer and sedimented at 12,000 x g. The initial supernatant from the mitochondrial fraction was then centrifuged at 109,000 x g for 60 min, the resulting pellet and supernatant were employed conventionally as the microsomal and cytosol fractions of dog pancreas, respectively. The subcellular fractions were kept at -20°C until incubations were started.

Enzyme assays. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase was determined by measuring both the reduction of androstenedione to testosterone and androstenedione formation from testosterone. Unless otherwise noted, the assay mixture contained, in a total volume of 1 ml, steroid substrate (50 nmol; 200,000 cpm) added in 0.05 ml

of 95% ethanol, 1.35 μmol of NAD^+ or 1.35 μmol of NADH , dissolved in 5 mM potassium phosphate buffer, containing 1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 10 μM PMSF, and 7 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0. The reactions were initiated by the addition of appropriate quantities of the enzyme preparation. The assays were conducted at 37°C for 10 min in air under constant shaking in a Dubnoff-type metabolic incubator. Blank incubations were prepared without nucleotide cosubstrate as well as using enzyme preparations inactivated by heating at 98°C for 2 min.

Enzyme reactions were stopped by the addition of 10 volumes of diethyl ether; androstenedione and testosterone (50 μg each per flask) were added to the mixture as carrier steroids, and the extraction was repeated twice with 10 volumes of diethyl ether. The extracts were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure. The final residue was redissolved in 0.2 ml of ethanol. An aliquot of 0.05 ml was used to quantitate recovery and 0.05 ml was chromatographed on a 0.2 mm thin-layer sheet of silica gel 60 F₂₅₄, in a solvent system of methylene dichloride:ethyl acetate (80:20, v/v). The spots of the carrier steroids were visualized under ultraviolet light at 254 nm. The silica gel containing the identified compounds was scraped out of the thin-layer sheet and transferred into scintillation vials.

For scintillation counting, 10 ml of a toluene solution, containing 0.5% 2,5-diphenyloxazole and 0.05% 1,4-bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)benzene, was added to each vial. Radioactivity was determined using a Packard Tri-carb Liquid Scintillation Spectrometer (Model 3255). The counting efficiency for tritium was of 60%.

The amount of product was expressed in nmoles by dividing its radioactivity by the specific activity of the initial substrate. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity was expressed as nmoles of product formed per mg of protein per min.

Protein concentrations were determined by the Coomassie blue G dye-binding technique of Bradford (12), with bovine serum albumin used as standard.

Kinetic data were fitted to the Michaelis-Menten equation and the corresponding parameters calculated according to Wilkinson (13).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of Products. Only one radiolabeled product which comigrated with testosterone was formed from [^3H]androstenedione in incubation mixtures containing cell-free homogenates of dog pancreas and NADH . This compound was identified as authentic testosterone demonstrating constant specific radioactivity through recrystallization with non-radioactive testosterone. Similarly, the only radioactive product obtained from [^3H]testosterone in the presence of NAD^+ was identified as androstenedione by its mobility on thin-layer chromatography and recrystallization with authentic non-radioactive androstenedione. The radioactivity recovered as androstenedione and testosterone on the thin-layer chromatograms averaged 93% under the conditions used in the pres-

ent study. No detectable radioactive compounds were formed when heat-denatured homogenates of dog pancreas were employed.

Subcellular Localization. The results obtained on subcellular fractionation of the homogenate are summarized in Table I. More than 86% of both oxidative and reductive activities of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, found in the whole homogenate, were concentrated in the mitochondrial fraction with a 4-fold increase in the specific activity. The remaining activity was found in the particulate sediment of centrifugation at 600 x g. Treatment of the mitochondrial fraction with phospholipase A resulted in a 90% decrease of the enzyme activity and attempts to solubilize the enzyme, using sonication as reported for the testicular microsomal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (14), were unsuccessful. These observations suggest that the enzyme is tightly bound to the membrane and its activity related to the membrane structure.

Cofactor Requirement. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase of dog pancreas appeared to be a NAD(H)-specific enzyme. Androstenedione was not reduced by the enzyme when NADPH at the high concentration of 2.0 mM was used as cosubstrate. Similarly, NADP⁺ could not substitute for NAD⁺ in the reverse enzyme reaction for testosterone. At a high fixed concentration of the corresponding steroid substrate (80 μ M), the apparent Michaelis constants (K_m) for NADH and NAD⁺ were determined to be 157 μ M and 315 μ M, respectively. Bioconversion of steroid substrates could not be detected in the absence of added pyridine nucleotide.

The mitochondrial localization and the NAD(H)-specificity of this enzyme are in contrast to the microsomal localization and

TABLE I
INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF THE 17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY
IN CANINE PANCREATIC TISSUE

Subcellular Fraction	Protein mg/ml	Volume ml	Androstenedione Reduction			Testosterone Oxidation		
			Specific activity (μ mol. $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	Total activity (μ mol.min)	Activity recovered (%)	Specific activity (μ mol. $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	Total activity (μ mol.min)	Activity recovered (%)
Homogenate	14.8	505.0	0.081	0.605	100.0	0.111	0.829	100.0
Nuclei	14.5	50.0	0.104	0.075	12.4	0.150	0.108	13.0
Mitochondria	37.8	45.0	0.317	0.539	89.0	0.420	0.714	86.1
Microsome	38.2	11.0	0.027	0.011	1.8	0.051	0.021	2.5
Cytosol	11.3	380.0	0.000	0.000	00.0	0.003	0.012	1.4

the NADP(H) of the testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (14-16).

Kinetics. The amount of either testosterone or androstenedione produced from the corresponding substrates by the mitochondrial fraction of dog pancreas increased proportionately to the protein concentrations of the tissue preparation (Fig.1a). In time-course studies of the reductase and oxidase functions of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with a fixed protein concentration of the pancreatic mitochondrial fraction, the amount of the respective steroid product increased linearly with time of incubation for at least 30 min (Fig.1b).

pH Dependency. The pH dependence of both, reductase and oxidase activities of the pancreatic enzyme was examined using three different buffer systems; 0.05 M sodium acetate, pH between 4.0 and 6.0; 0.05 M Tris-HCl, pH from 6.5 to 9.0; and 0.05 M glycine-NaOH, pH from 9.5 to 12.0. The optimal pH of the enzyme for androstenedione reduction was found to be at 6.0-6.5, whereas for oxidation of testosterone it was 7.5. The enzyme reaction was found to be reversible at a pH between 5.5 and 8.5, with oxidation and reduction occurring at approximately the same rate at a pH of around 7.0 (Fig.2a).

Temperature Dependency. Initial velocities of the enzyme reaction were determined at an incubation temperature between 20°C and 70°C

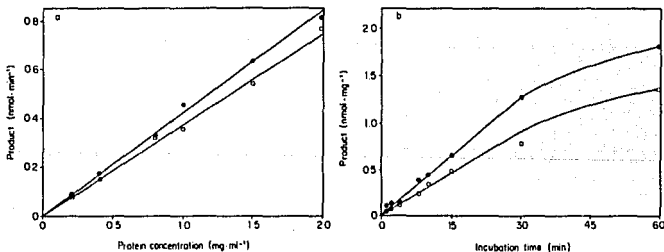


Fig.1. (a): Effect of protein concentrations of the pancreatic tissue preparation on the product formation. Enzyme activity was determined as described in the text. The amount of testosterone (o-o) or androstenedione (●-●) formed by the mitochondrial fraction was plotted against protein concentration. (b): Time-course of product formation with the pancreatic tissue preparation. Incubations were performed with the mitochondrial fraction (1.0 mg of protein per flask) as described in the text, and the amount of testosterone (o-o) or androstenedione (●-●) formed was plotted against incubation time.

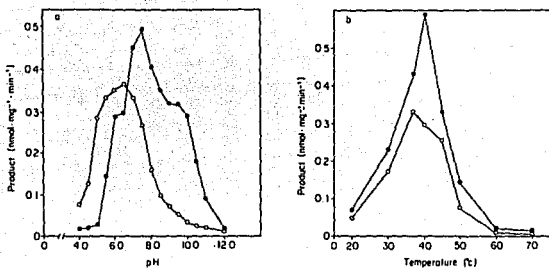


Fig. 2. 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity as a function of (a) pH and (b) temperature. Incubations were performed with the pancreatic mitochondrial preparation containing 0.4 mg of protein per flask. The amount of testosterone (o-o) or androstenedione (●-●) formed was plotted.

(Fig.2b). The apparent maximal reductive activity for androstenedione was attained at 37°C , and maximal rate for testosterone oxidation was achieved at 40°C . Both, reductive and oxidative activities rapidly decreased at temperatures over 40°C until no enzymatic conversion could be measured.

Substrate Saturation Kinetics. The effect of increasing concentrations of androstenedione and testosterone (in the range of 2.0 to $80.0\ \mu\text{M}$), incubated separately, upon the initial velocity of pancreatic mitochondrial 17β -hydroxysteroid dehydrogenase is illustrated in Fig.3. The apparent K_m for androstenedione was determined to be $9.5 \pm 0.9\ \mu\text{M}$ (SE) in phosphate buffer, pH 7.0 and 37°C .

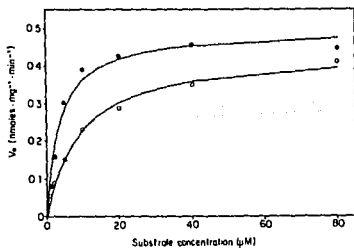


Fig. 3. Direct plot of initial velocities as a function of steroid substrate concentration. Androstenedione (o-o); testosterone (●-●). Protein concentration of the mitochondrial enzyme preparation was $0.4\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$. Full lines are corrected curves given by the computer. Each point represents the average of at least two assays.

Using testosterone as a substrate, the apparent K_m value was $3.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (SE) under the same conditions. Both, androstenedione and testosterone yielded an identical V_{max} value of $0.4 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, agreeing with the results obtained in the pH studies, in which oxidation and reduction occur at the same rate at a pH of around 7.0 (Fig. 2a).

The K_m values estimated in the present experiments were of the same order of magnitude as those of the 17β -hydroxysteroid dehydrogenases of porcine, rat, and human testes, which are physiologically involved in the biosynthesis of testosterone (14-16).

Although the physiological role of pancreatic 17β -hydroxysteroid dehydrogenase remains to be determined, the presence of steroid-transforming enzymes supports the hypothesis that the pancreas could be an extragonadal site of steroid hormones biosynthesis.

ACKNOWLEDGMENT: This work was supported in part by research grant ICSAXNA-060132 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT), México.

ESTÁ TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- REFERENCES
1. Sandberg, A.A. and Rosenthal, H.E. (1978) *J. Steroid Biochem.* 9, 1132-1139.
 2. Pousette, A., Fernstad, R., Theve, N.O., Skölderfors, H. and Carlström, K. (1985) *J. Steroid Biochem.* 23, 115-119.
 3. Greenway, B.A., Iqbal, M.J., Johnson, P.J. and Williams, R. (1981) *Br. Med. J.* 283, 751-753.
 4. Corbishley, T.P., Iqbal, M.J., Wilkinson, M. and Williams, R. (1986) *Cancer* 57, 1992-1995.
 5. Iqbal, M.J., Greenway, B., Wilkinson, M.L., Johnson, P.J. and Williams, R. (1983) *Clin. Sci.* 65, 71-75.
 6. Greenway, B., Iqbal, M.J., Johnson, P.J. and Williams, R. (1983) *Br. Med. J.* 286, 93-95.
 7. McColl, K.E.L. (1983) *Br. Med. J.* 286, 641-642.
 8. Militeno, C., Sperti, C. and Foresta, C. (1984) 30, 122.
 9. Greenway, B.A., Duke, D., Pym, B., Iqbal, M.J., Johnson, P.J. and Williams, R. (1982) *Br. J. Surg.* 69, 595-597.
 10. Lhoste, E.F., Roebuck, B.D., Stern, J.E. and Longnecker, D.S. (1987) *Pancreas* 2, 38-43.
 11. Tartakoff, A.M. and Jamieson, J.D. (1974) *Methods in Enzymology* 31, 41-59.
 12. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 13. Wilkinson, G.N. (1961) *Biochem. J.* 80, 324-332.
 14. Inano, H. and Tamaoki, B. (1974) *Eur. J. Biochem.* 44, 13-23.
 15. Bogovich, K. and Payne A.H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5552-5559.
 16. Oshima, H., Yoshida, K. and Troen, P. (1980) *Endocrinol. Jap.* 27, 107-115.

Δ^5 - 3β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE-ISOMERASE ACTIVITY
IN CANINE PANCREAS

G. Mendoza-Hernández¹, I. López-Solache and J.L. Rendón

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad
Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, 04510,
Mexico City, D.F., Mexico.

(Received in final form May 31, 1990)

Summary

Activity of Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase coupled with steroid- Δ^5 - Δ^4 -isomerase was demonstrated for the first time in the pancreas. The enzyme complex was assayed by measuring the conversion of pregnenolone to progesterone as well as of dehydroepiandrosterone to androstenedione and found to be localized primarily in the mitochondrial fraction of dog pancreas homogenates. The Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase used either NAD⁺ or NADP⁺ as co-substrates, although maximal activity was observed with NAD⁺. In phosphate buffer, pH 7.0 and 37°C, the apparent K_m values of the dehydrogenase were $8.54 \pm 0.7 \mu\text{M}$ for pregnenolone and $9.81 \pm 0.8 \mu\text{M}$ for NAD⁺. The apparent V_{max} was determined as $0.82 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Under the same conditions the K_m values for dehydroepiandrosterone and NAD⁺ were $3.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $9.63 \pm 1.6 \mu\text{M}$, respectively, and the apparent V_{max} was $0.62 \pm 0.01 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Evidence suggesting the involvement of steroid hormones in the physiological functions of the pancreas has been provided by several authors (1-7). In addition, the activities of two steroid transforming enzymes, aromatase and 5 α -reductase, have been measured in cell-free homogenates of human (normal adult, fetal, and malignant) pancreatic tissue (8). Recent studies from this laboratory demonstrated an active 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in male dog pancreatic mitochondrial preparations that catalyzed the oxidoreduction between androstenedione and testosterone (9). The above findings suggest that the pancreas could be a steroid hormones producing gland.

¹To whom correspondence should be addressed.

Trivial names and abbreviations: Pregnenolone, 3β -hydroxy-5-pregnen-20-one; dehydroepiandrosterone, 3β -hydroxy-5-androsten-17-one; progesterone, 4-pregnene-3,20-dione; androstenedione, 4-androstene-3,17-dione; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

The enzymatic conversion of Δ^3 - 3β -hydroxysteroids to the Δ^4 -3-oxo configuration is an important step in the pathways of steroid hormones biosynthesis. In mammalian steroid producing tissues, this step is catalyzed by the enzyme complex Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase [EC 1.1.1.145] and steroid- Δ^3 -isomerase [EC 5.3.3.1]. Dehydrogenation is the first and rate-limiting step of the reaction (10).

The present study was performed to obtain more information on the steroid hormone biosynthetic pathways in the pancreas. The results demonstrate that cell-free preparations from dog pancreas can readily form progesterone and androstenedione from pregnenolone and dehydroepiandrosterone, respectively; indicating the presence of the enzyme complex Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase with activity towards both Δ^3 - 3β -hydroxy- C_{21} and C_{19} steroids.

Materials and Methods

Reagents: [$7\text{-}^3\text{H(N)}$]Pregnenolone (specific activity, 22.6 Ci/mmol) and [$1,2\text{-}^3\text{H(N)}$]dehydroepiandrosterone (specific activity, 43.2 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear Corp. (Boston, Mass.), and rechromatographed on a Sephadex LH-20 column as previously described (8). The radiochemical purity of the steroids was confirmed by ascending chromatography on thin-layer alumina sheets pre-coated with silica gel F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) in the solvent system chloroform:acetone (80:8, v/v). 5-pregnene-3,20-dione, 5-androstene-3,17-dione, and other non-radioactive steroids were obtained from Steraloids, Inc. (Wilton, N.H.) and recrystallized prior to use. Each radioactive steroid substrate was diluted with its respective non-radioactive crystalline steroid to obtain appropriate specific radioactivity for the enzyme assays. 2-mercaptoethanol, pyridine nucleotides, (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH), EDTA, PMSF, PFO, dimethyl-POPOP, and Triton X-100 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); Analytical-grade solvents were from E. Merck and used as supplied. Other chemicals were of analytical-grade and obtained from standard suppliers. Deionized water was used for all aqueous solutions.

Tissue Preparation: Pancreata of male mongrel dogs were kindly provided by the Instituto Nacional de Cardiología (Mexico, D.F.). Immediately after their removal, a cell-free homogenate, mitochondrial, microsomal, and cytosol fractions were prepared by differential centrifugation as described previously (11), using 0.154 M KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 7.0 mM 2-mercaptoethanol as the homogenization medium. All procedures were performed at 0-4°C, and the subcellular fractions were kept at -20°C until incubations were started.

Assays of Enzymatic Activity: Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity was determined by measuring the conversion of pregnenolone to progesterone as well as of dehydroepiandrosterone to androstenedione. Unless otherwise noted, the reaction mixture contained in a total volume of 1.0 ml: [^3H]-steroid substrate (50 nmol; 100,000 cpm); 1.5 mM NAD⁺, 5.0 mM

potassium phosphate buffer, containing 1.0 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 7.0 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0, and appropriate protein quantities of the pancreatic preparation. Incubations were performed at 37°C for 10 min under constant shaking in a Dubnoff-type metabolic incubator. The reactions were stopped by adding 10 ml of diethyl ether. [14 C]Progesterone or [14 C]-androstenedione (25 μ g; 3500 cpm) were added to the mixture, and the extraction was repeated twice with 10 volumes of diethyl ether. The combined extracts were evaporated to dryness under reduced pressure. The final residue was submitted to thin layer chromatography in a solvent system of chloroform:acetone (90:8, v/v). The silica gel containing the steroids was transferred into scintillation vials and the radioactivity quantitated in 10 ml of toluene:triton X-100 solution (2:1, v/v) containing 0.5% PPO and 0.05% dimethyl-POPOP (9).

The amount of product was expressed in nmoles by dividing its radioactivity by the specific radioactivity of the initial substrate.

Steroid-isomerase activity was assayed spectrophotometrically using 5-pregnene-3,20-dione or 5-androstene-3,17-dione as substrate. Reaction velocities were calculated from the initial linear increase of absorbance at 248 nm due to the 4-ene-3-oxosteroid formation (12). Since the rate of isomerization was faster than the overall reaction, the rate of formation of progesterone or androstenedione from pregnenolone or dehydroepiandrosterone, respectively, reflects the kinetics properties of the Δ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. The enzyme activity was expressed as nmoles of product formed per min per mg of protein.

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (13) with bovine serum albumin as a standard.

Kinetic data were fitted to the Michaelis-Menten equation and the corresponding parameters calculated according to the method of Wilkinson (14).

Results and Discussion

Identification of Products: Bioconversion of pregnenolone or dehydroepiandrosterone was investigated in cell-free homogenates of pancreatic tissue in the presence of NAD $^+$ or NADP $^+$ and the amount of radiolabeled metabolites produced after a 30-min incubation period was measured. Only a single radioactive product was formed from [3 H]pregnenolone in the presence of either NAD $^+$ or NADP $^+$. This compound comigrated with progesterone and was shown to be 96% pure by its specific radioactivity through recrystallization with authentic progesterone. Androstenedione was the only metabolite produced from [3 H]dehydroepiandrosterone and NAD $^+$ or NADP $^+$. Recrystallization with authentic crystalline androstenedione indicated that the product androstenedione was over 95% pure. The radioactivity recovered as pregnenolone and progesterone or dehydroepiandrosterone and androstenedione on the thin-layer chromatograms averaged 95.6% and 93.7%, respectively, under the conditions used in the present study. No detectable

radioactive compounds were formed when heat-denatured homogenates of dog pancreas were employed.

Subcellular Distribution: Each subcellular fraction obtained by differential centrifugation was incubated with progesterone or dehydroepiandrosterone as a substrate, and NAD⁺ under the assay conditions described in methods. Table I is a representative summary of the results. More than seventy percent of the Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity, for both steroid substrates found in the whole pancreatic homogenate, was concentrated in the mitochondrial suspension with the corresponding increase in the enzymatic specific activity. The remaining activity was found distributed between the microsomal fraction and the sedimented particles after centrifugation at 800 xg (nuclei and debris).

TABLE I

INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF THE Δ^5 -3 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE-ISOMERASE ACTIVITY IN CANINE PANCREATIC TISSUE

Subcellular Fraction	Protein mg/ml	Volume ml	Substrate: Progesterone			Substrate: Dehydroepiandrosterone		
			Specific activity (nmol/min/mg)	Total activity (nmol/min)	Activity recovered (%)	Specific activity (nmol/min/mg)	Total activity (nmol/min)	Activity recovered (%)
Homogenate	13.5	480.0	0.59	2.52	100.0	0.27	1.75	100.0
Nuclei	11.3	32.0	0.19	0.11	4.3	0.23	0.14	7.8
Mitochondria	24.3	100.0	0.75	1.81	72.1	0.55	1.34	76.5
Microsomes	34.0	16.0	0.38	0.22	8.6	0.26	0.15	8.6
Cytosol	5.0	357.0	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	0.0

The mitochondrial localization of the pancreatic Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase was somewhat surprising since this activity is known to be associated primarily to the microsomal fraction of mammalian steroidogenic tissues (15,16). However, in the human placenta, the enzymatic activity is equally distributed between mitochondria and microsomes (17,18), and substantial activity has been also observed in the mitochondrial fraction of adrenals and ovaries (19,20).

The mitochondrial pancreatic preparation could be stored at -20°C for at least two months with little loss of enzyme activity and was used in the following experiments as the source of the enzyme.

Co-substrate Specificity: The Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase of dog pancreas was shown to have dual co-substrate specificity. Either NAD⁺ or NADP⁺ could serve as electron acceptors in the reaction catalyzed by the enzyme. However, NAD⁺ was more reactive than NADP⁺ in catalyzing the oxidation of both steroid substrates. When the steroids substrates were incubated

separately, in the presence of NADP⁺ at a concentration of 0.2 mM, the amount of progesterone or androstenedione produced was only about 3% and 23%, respectively, of that obtained in the presence of an equimolar concentration of NAD⁺. The effect of increasing concentrations of NAD⁺ (in the range of 0.5 to 200 μ M) or NADP⁺ (0.1 to 15 mM) is illustrated in Fig. 1. With a high fixed concentration of pregnenolone (80 μ M), the apparent-Michaelis constants (K_m) for NAD⁺ and NADP⁺ were determined to be 9.61 ± 0.8 μ M and 2.44 ± 0.22 mM, respectively. Using dehydroepiandrosterone as a substrate, the apparent K_m value for NAD⁺ was 9.63 ± 1.6 μ M and that for NADP⁺ was 0.23 ± 0.03 mM. It should be noted that, in the presence of NAD⁺, the pancreatic enzyme showed a higher oxidation rate for pregnenolone, whereas, when NADP⁺ was used as a co-substrate, a preferential oxidation of dehydroepiandrosterone was observed.

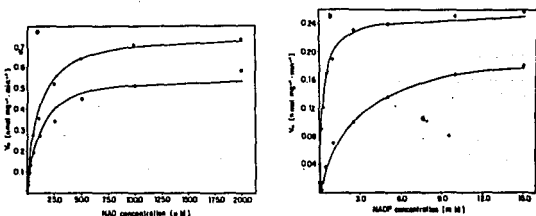


Fig. 1. Effect of increasing concentrations of (a) NAD⁺ or (b) NADP⁺ on mitochondrial Δ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. Incubations were performed for 10 min at 37°C in 0.5 mM phosphate buffer (pH 7.0) with 0.46 mg of mitochondrial protein, 80 μ M of [³H]-pregnenolone or [³H]dehydroepiandrosterone, and indicated concentrations of NAD⁺ or NADP⁺. The amount of progesterone (O--O) or androstenedione (□--□) produced was determined as described under "Materials and Methods". Each point is the mean of two to three determinations.

The pancreatic dehydrogenase resembles the Δ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenases from other steroidogenic organs in its nucleotide specificity and requirement for NAD⁺ for maximal activity (18,21). The K_m values for NAD⁺ determined in the present study were similar to those reported for the Δ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenases from human placenta (18,22), testes (21,23), and adrenal glands (24,25).

Kinetics. Under the standard enzyme assay conditions, the amount of either progesterone or androstenedione produced from the corresponding substrates by the mitochondrial preparation of dog pancreas increased proportionately to the protein concentration up to 1.5 mg (Fig.2a). In time-course studies with a fixed protein concentration of the mitochondrial suspension, the amount of progesterone produced from pregnenolone increased linearly with time of incubation for at least 20 min. Using dehydroepiandrosterone as a substrate, first-order enzyme kinetics were obtained during an incubation times up to 15 min (Fig.2b).

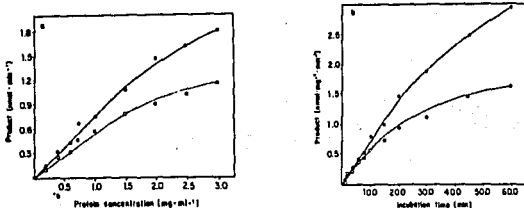


Fig. 2. (a) Effect of protein concentration of the pancreatic mitochondrial preparations on the synthesis of progesterone and androstenedione. The indicated amount of the mitochondrial suspension was incubated with [3 H]pregnenolone or [3 H]dehydroepiandrosterone (80 μ M) and 1.5 mM NAD. The amount of progesterone (●-●) or androstenedione (○-○) produced, respectively, was determined as described under "Materials and Methods". (b) Time-course of product formation with the pancreatic mitochondrial preparation. Incubations were performed with the mitochondrial suspension (1.14 mg of protein per flask) in the standard enzyme assay system. The amount of progesterone (●-●) or androstenedione (○-○) produced was plotted against incubation time.

Effect of pH on Enzymatic Activity: The pH dependence of the pancreatic $\Delta^3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity was examined in the range from pH 5.0 to 12.0, using three different buffer systems; 0.2 M sodium acetate, pH from 5.0 to 6.0; 0.2 M Tris-HCl, pH between 6.5 and 9.0; and 0.2 M glycylglycine-NaOH, from 9.5 to 12.0, containing 0.5 mM PMSF, 7 mM 2-mercaptoethanol. The optimal pH of the enzyme for pregnenolone was found to be at 8.0, whereas with dehydroepiandrosterone as a substrate the enzymatic activity increased with increasing pH reaching an apparent plateau between pH 8.0 and 9.5. The enzyme reaction for pregnenolone proceeded at approximately the same rate as the one for dehydroepiandrosterone at a pH around 9.0. When pH was

increased above 9.0, a higher reaction rate for dehydroepiandrosterone was observed (Fig.3a).

Effect of Temperature on Enzymatic Activity: Initial velocities of the enzyme reaction were determined at an incubation temperature between 20°C and 60°C (Fig.3b). The enzyme activity for both steroid substrates increased with increases of temperature up to 45°C, and rapidly decreased at temperatures exceeding 45°C until no enzymatic conversion could be measured.

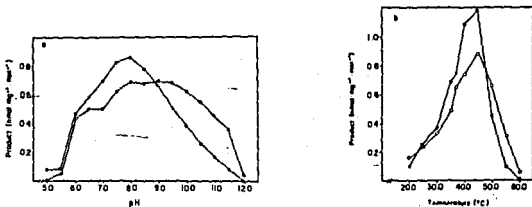


Fig. 3. Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity as a function of (a) pH (b) temperature. Incubations were performed with the pancreatic mitochondrial suspension containing 0.44 mg of protein per flask. Other assay conditions are described in the text. (●-●), progesterone produced from pregnenolone; (○-○), androstenedione produced from dehydroepiandrosterone. Each point represents the average of two to three determinations.

Substrate Saturation Kinetics: The effect of increasing concentrations of either pregnenolone and dehydroepiandrosterone (in the range of 0.5 to 80 μ M), on the initial velocity of pancreatic mitochondrial Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase is illustrated in Fig.4. The apparent K_m for pregnenolone at a high fixed NAD⁺ concentration in phosphate buffer (10 times K_m) was determined to be $8.54 \pm 0.72 \mu$ M at pH 7.0 and 37°C. Using dehydroepiandrosterone as a substrate, an apparent K_m of $3.3 \pm 0.23 \mu$ M was calculated under the same conditions. The maximum velocity (V_{max}) for pregnenolone and dehydroepiandrosterone was 0.82 ± 0.02 and $0.82 \pm 0.01 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively.

The apparent K_m values determined with the pancreatic mitochondrial preparation are similar to values obtained with human placental mitochondrias or microsomes (17), and with purified Δ^3 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase from human placenta (26) and bovine adrenal microsomes (27).

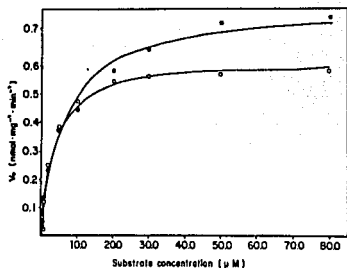


Fig. 4. Direct plot of initial velocities as a function of steroid substrate concentration. Incubations were performed with 0.44-0.48 mg of mitochondrial protein, and increasing concentrations of pregnenolone or dehydroepiandrosterone. Progesterone (O--O) and androstenedione (O--O) produced were determined as described in the text. Each point represents the means of at least three determinations.

The Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase complex catalyzes an obligatory step in the biosynthetic pathways of steroid hormones. This study demonstrates its presence in canine pancreas and supports the hypothesis that this gland could be an extragonadal site of steroid hormones biosynthesis.

Acknowledgment: This work was supported in part by research grant P228CCOX891530 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT), México.

References

1. B. ULBERG and G. BENGTSOON, *Acta endocr. Copenh.* **43** 75-86 (1983).
2. A. GROSSMAN, A.M. BOCTOR and B. LANE, *Endocrinology* **38** 956-959 (1989).
3. R.Y. KIRDANI, M.J. VARKARAKIS, G.P. MURPHY and A.A. SANDBERG, *Endocrinology* **90** 1245-1251 (1972).
4. A.A. SANDBERG and H.E. ROSENTHAL, *J. steroid Biochem.* **5** 989-975 (1974).
5. A. POUSETTE, *Biochem. J.* **157** 229-232 (1978).
6. A.A. SANDBERG and H.E. ROSENTHAL, *J. steroid Biochem.* **11** 293-299 (1979).
7. A. POUSETTE, R. FERNSTAD, N.O. THEVE, H. SKOLDEFORS and K. CARLSTROM, *J. steroid Biochem.* **23** 115-119 (1985).
8. M.J. IQBAL, B. GREENWAY, M.L. WILKINSON, P.J. JOHNSON and R. WILLIAMS, *Clin. Sci.* **65** 71-75 (1983).

9. G. MENDOZA-HERNANDEZ, I. LOPEZ-SOLACHE, J.L. RENDON, V. DIAZ-SANCHEZ and J.C. DIAZ-ZAGOYA, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **152** 378-382 (1988).
10. D.B.GOWER and G.H. COOKE, *J. steroid Biochem.* **19** 1527-1556 (1983).
11. A.M. TARTAKOFF and J.D. JAMIESON, In *Methods in Enzymology XXXI* 41-59 S. Fleischer and L. Packer, Ed. Academic Press, New York (1974).
12. F.S. KAWAHARA, In *Methods in Enzymology V* 527-539 S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Ed. Academic Press, New York (1982).
13. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193** 265-275 (1951).
14. G.N. WILKINSON, *Biochem. J.* **80** 324-332 (1961).
15. B. TAMAOKI, *J. steroid Biochem.* **4** 89-118 (1973).
16. A.M. MOUSTAFA and S.B. KORITZ, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **148** 823-825 (1975).
17. F. FERRE, M. BREUILLER, L. CEDARD, M.J. DUCHESNE, M. SAINTOT, B. DESCOMPS and A. CRASTES DE PAULET, *Steroids* **28** 551-570 (1975).
18. T. RABE, K. BRANDSTETTER, J. KELLERMANN and B. RUNNEBAUM, *J. steroid Biochem.* **17** 427-433 (1982).
19. R.S. BASCH and M.J. FINEGOLD, *Biochem. J.* **125** 983-989 (1971).
20. S. SULIMOVICI and G.S. BOYD, *Eur. J. Biochem.* **7** 549-556 (1969).
21. D.F. FAN and P. TROEN, *J. Clin. Endocr. Metab.* **41** 563-574 (1975).
22. W. GIBB, *Steroids* **31** 459-466 (1979).
23. H. OSHIMA, D.F. FAN and P. TROEN, *J. clin. Endocr. Metab.* **40** 573-581 (1975).
24. R.W. MCCUNE, S. ROBERTS and P.L. YOUNG, *J. biol. Chem.* **245** 3859-3887 (1970).
25. H. ISHII-OHBA, N. SAIKI, H. INANO and B. TAMAOKI, *J. steroid Biochem.* **24** 753-760 (1988).
26. J.L. THOMAS, E.A. BERKO, A. FAUSTINO, R.P. MYERS and R.C. STRICKLER, *J. steroid Biochem.* **31** 785-793 (1988).
27. A. HIWATASHI, I. HAMAMOTO and Y. ICHIKAMA, *J. Biochem.* **88** 1519-1526 (1985).