

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Fac. de Medicina

1/261
20
24

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA 20 ALFA-HIDROXIESTEROIDE
DESHIDROGENASA DE TESTICULO DE BOVINO

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en
Ciencias Biomédicas (Biología Molecular).

Presenta

María Eugenia Salinas y Mejía

FALLA DE ORIGEN

México, D.F., agosto de 1987.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CONTENIDO:

INTRODUCCION

OBJETIVO

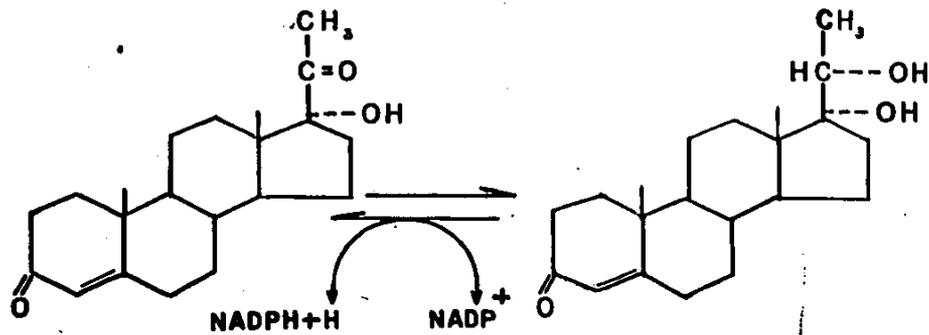
NETABOLISMO DE ANDROGENOS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

BIBLIOGRAFIA



17 α - HIDROXIPROGESTERONA

17 α ,20 α -DIHIDROXI-4-PREGNEN-3ONA

REACCION CATALIZADA POR LA 20 α -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE TESTICULO DE BOVINO.

INTRODUCCION

Los testículos están formados de: un sistema de túbulos y células intersticiales de Leydig localizados entre los túbulos que producen esteroides androgénicos. Estas células forman del 2-37% del volumen testicular dependiendo de la especie. Existen aproximadamente 25×10^6 y 700×10^6 células de Leydig en la rata y en el humano, respectivamente. (1) (2)

Las reacciones bioquímicas para formar andrógenos se inician con la presencia de colesterol metabólicamente activo que puede derivar de 3 fuentes: biosíntesis de novo a partir de acetato, de ésteres de colesterol almacenado y del plasma sanguíneo vía receptor de lipoproteínas VLDL-LDL (3). La poza metabólicamente activa de colesterol se transporta a la mitocondria, en donde enzimas específicas producen la ruptura de la cadena lateral del colesterol y dan lugar a la pregnenolona (4) la cual se transporta al retículo endoplásmico liso (REL), donde se convierte a testosterona por una serie de enzimas microsomales, (5) las cuales incluyen hemoproteínas responsables de la ruptura de la cadena lateral de esteroides de 21-C para dar lugar a la serie de 19-C. Estas son enzimas del sistema P-450 capaces de aceptar electrones de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ y activar oxígeno, un átomo del cual se transfiere al sustrato (actividad de monooxigenasa). La testosterona difunde a través de la membrana celular y es captada en el líquido extracelular y es transportada en la circulación unida a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina y proteínas específicas transportadoras de hormonas esteroides,

como es la globulina fijadora de testosterona (TeBG). Este arreglo espacial con alto grado de organización de las enzimas que sintetizan esteroides tiene importantes aspectos en la regulación:

- Facilita la interacción de esteroides y esteroides hidrofóbicos con el oxígeno o el hidrógeno disueltos en el citoplasma de las células de Leydig.

- Existe una vía multienzimática unida a membrana que reduce el tiempo de difusión del sustrato e impide la pérdida de intermediarios biosintéticos del complejo membrana-enzima (6).

- La compartimentalización de las reacciones de esteroidogénesis limita los productos potenciales producidos por los testículos; se establecen sitios de control cuando un sustrato está separado de la enzima, la cual se requiere para catalizar su conversión al producto. (7)

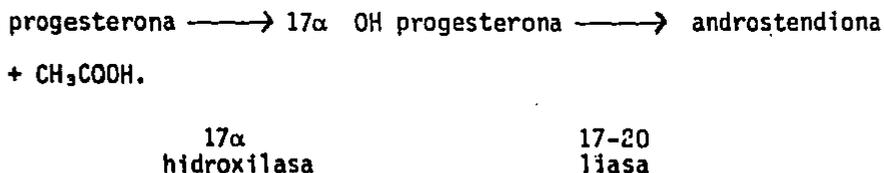
- Finalmente las alteraciones bioquímicas a nivel de membrana afectan la actividad de enzimas esteroideas. Las evidencias de compartimentalización de este tipo de enzimas proporciona bases estructurales para la regulación de la biosíntesis de testosterona. (8)

Actualmente sabemos que se requieren 5 enzimas para la conversión de colesterol a testosterona. En este proceso la cadena lateral del colesterol sufre ruptura en dos sitios, para que una molécula de 27-C, se forme en una de 19-C; el anillo A del esteroide es oxidado a una configuración Δ^4 -3 ceto. Las enzimas son:

- 20-22 hidroxilasa, liasa P450 scc.
- complejo 3β -hidroxiesteroide DH-3 cetosteroide Δ^4 - 5 isomerasa.
- 17α -esteroide hidroxilasa.
- 17-20 liasa
- 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

El paso clave en la síntesis de testosterona es el catalizado por la 20-22 liasa (9). La hormona luteinizante (LH) regula la actividad total de la vía por estimulación de la síntesis de testosterona lo que resulta en la acumulación de una proteína unidora de colesterol que facilita el transporte de éste a la mitocondria o su unión al sistema enzimático P450 scc. (10). Aunque también la regulación de la biosíntesis de testosterona está bajo el control de otros tipos de hormonas, como la FSH, prolactina.

En la esteroidogénesis testicular, se forma un intermediario 17 oxigenado que se somete a ruptura en la unión del C-17 y C-20 para facilitar la formación de androstendiona:



En la investigación de la biosíntesis de andrógenos; la 17α -hidroxiprogesteroína ha sido propuesta como el intermediario oxigenado más probable

(11). A partir de este sustrato el interés por las proteínas con actividades catalíticas específicas es mayor, y las fracciones solubles de tejido testicular de diferentes especies de mamíferos contienen actividad de 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa que cataliza específicamente la reducción del grupo carbonilo en el C-20 de la 17 α -hidroxiprogesterona. Se purificó a homogeneidad la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa de testículo de bovino con la finalidad de estudiar y entender su papel fisiológico, integrado al conjunto de conocimientos que existen a la fecha sobre las hormonas esteroideas y su regulación.

OBJETIVO

El objetivo de la purificación a homogeneidad de la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa de testículo de bovino fue efectuar estudios comparativos con otras enzimas de mamíferos que se han purificado (12) (13) (14), algunas hasta la formación de cristales (15). Esta actividad enzimática se ha reportado en órganos muy diversos como es el hígado (16) ovario (17), testículo (18), adrenales (19) y placenta (20). Elegimos el tejido testicular de bovino para lograr una contribución al esquema clásico de biosíntesis de andrógenos en este modelo.

Es relevante señalar que la especificidad de sustrato para esta enzima depende del órgano estudiado. La 17 α -hidroxiprogesterona es específica para la enzima testicular.

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

I. Precursores.

Tanto el acetato como el colesterol son sustratos para la biosíntesis de andrógenos. El acetato es un precursor efectivo in vivo e in vitro en experimentos de perfusión de testículos, adrenales y ovario. El colesterol se convierte activamente en esteroides, in vivo, en los casos en que está presente un adenona adrenal virilizante. El colesterol no es un adecuado sustrato in vitro. El ácido mevalónico es un precursor de la dehidroepian-drosterona en casos de adenona adrenal. (21)

La pregnenolona es convertida a andrógenos en los tres órganos productores de esteroides: testículo, ovario y adrenales.

La progesterona es considerada un sustrato clásico para la biosíntesis de andrógenos, a partir de los estudios iniciales de Slaunwhite y Samuels (22) y posteriormente de Savard, (23) quienes demostraron que este esteroide es convertido rápidamente a androstendiona y testosterona. Estos estudios se han confirmado en repetidas ocasiones.

II. Biosíntesis.

Slaunwhite y Samuels y poco tiempo después Savard (22) (23) demostraron que la formación de andrógenos requiere de la 17α -hidroxilación de progesterona. Hay 2 caminos de esteroidogenesis, el Δ^5 y el Δ^4 ; el primero se refiere a la doble ligadura en la posición 5-6 y Δ^4 se refiere a la doble ligadura en posición 4-5. Los principales esteroides biológicamente

activos tienen la configuración Δ^4 .

La actividad de la 17α -hidroxilasa sobre la progesterona y la pregnenolona genera 17α hidroxiprogesterona, que se considera un precursor inmediato de androstendiona, sobre la cual actúa la $17-20$ liasa. Posteriormente la reducción del grupo 17 -ceto por la 17β -hidroxioesteroide oxido-reductasa forma la testosterona. También da lugar a testosterona la conversión de dehidroepiandrosterona a androstendiona, a partir de 17α -hidroxipregnenolona, y su reducción posterior.

La vía metabólica para la síntesis de dehidroepiandrosterona se descubrió a través de incubaciones de un homogenado preparado de adenoma adrenal humano con pregnenolona- $[7-^3H]$ y resultó en la formación de dehidroepiandrosterona- $[^3H]$ (24). Y pregnenolona marcada con tritio, cuando se inyectó a una mujer con virilización por adenoma adrenal, se convirtió en dehidroepiandrosterona (25). La conversión de 17α -hidroxipregnenolona a dehidroepiandrosterona fue establecida por Solomon y cols. (26). El aislamiento de dehidroepiandrosterona de testículos, realizado por Neher y Wettstein (27), apoyaron la tesis de que este andrógeno no es exclusivo de tejido adrenal. Un tumor adrenal de células intersticiales de humano también formó dehidroepiandrosterona a partir de pregnenolona. (28).

La dehidroepiandrosterona tritiada administrada intravenosamente produjo la formación de testosterona y androstendiona tritiada en la sangre. Esta

transformación ocurre en el hombre aun en ausencia de testículos. Las evidencias experimentales han señalado después de largos años de estudio que la testosterona es el producto principal de la esteroidogénesis en el hombre. La ruta biosintética Δ^5 es utilizada para la formación de dehidroepiandrosterona y luego androstendiona y testosterona; o de DHA a androstendiol y testosterona; aunque no es suficientemente claro cuál es la ruta favorecida (29).

III. Catabolismo.

La testosterona plasmática es metabolizada por varios caminos; junto con sus metabolitos activos se excreta más del 90% por la orina como metabolitos inactivos. Aproximadamente la mitad del recambio diario es en la forma de 17-cetosteroides urinarios principalmente androsterona y etíocolonona; y la otra mitad como compuestos polares dioles trioles y conjugados.

La testosterona actúa como precursor de otros metabolitos fisiológicamente activos, y puede sufrir reducción irreversible a esteroides 5α -reducidos, principalmente la dihidrotestosterona que ejerce funciones en la diferenciación sexual durante la embriogénesis y tiene la principal acción androgénica en la función sexual del adulto.

La presencia de 5α -androst-16-en-3 α ol es un importante catabolito de la testosterona. Es un compuesto aislado de tejido testicular por Prelog y Ruzicka (30). Los estudios de Brooksbank y Haslewood (31) proporcionaron

prueba importante donde el compuesto fue excretado en la orina humana conjugado con ácido glucurónico. También fue detectado en la orina humana por Mason y Schneider (32), Dorfman y cols. (33) y Miller y cols. (34).

Por otro lado los andrógenos circulantes pueden ser convertidos en tejidos periféricos de ambos sexos en estrógenos, los que pueden actuar en concierto con los andrógenos, o tener efectos independientes y en algunos casos efectos opuestos.

Las consecuencias fisiológicas de la circulación de la testosterona es el resultado de los efectos combinados de la testosterona por sí misma, más los de andrógenos activos y metabolitos estrogénicos. [fig. A]

ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA ESTEROIDOGENESIS EN TESTICULO

1.20, 22 hidroxilasa y 20.22 liasa.

La conversión de colesterol a pregnenolona se lleva a cabo en la mitocondria de tejido testicular (35); así como también en corteza adrenal y en el cuerpo lúteo (36). Tiene requerimientos por $\text{NADPH} + \text{H}^+$ y oxígeno molecular. El $\text{NADPH} + \text{H}^+$ se requiere para las hidroxilaciones esteroideas y sirve como fuente de e^- que activan al oxígeno a través de una flavoproteína, no hemínica y con el complejo citocromo P-450 (37). Las hidroxilasas, también llamadas antiguamente oxidasas de función mixta, activan un átomo de oxígeno para que forme el grupo hidroxilo en el sustrato, y el se-

gundo átomo forma una molécula de agua.

La ruptura de la cadena lateral es por la hidroxilación de los C.20 - 22. El 20 α -hidroxicolesterol sirve como precursor efectivo de pregnenolona.

2. 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, Δ^4 - Δ^5 isomerasa.

Esta enzima actúa en esteroides de 19-C y 21-C, actúa sobre grupos 3 β -hidroxi. La actividad en testículos de rata bajo condiciones óptimas es de 1 a 2 μ moles de producto formado por hora por gramo de tejido (38), utilizando NAD⁺ como cofactor preferentemente (39) (40). La isomerasa testicular y de corteza adrenal es microsomal (41). La de testículo produce la pérdida del hidrógeno de la posición 4 β .

3. 17 α -hidroxilasa.

Cataliza una reacción irreversible que requiere NADPH+H⁺ y oxígeno molecular (42), por sus requerimientos se parece a otros tipos de hidroxilasas esteroideas que utilizan el sistema P-450. Por espectrofotometría de masas se hizo la confirmación directa de que un átomo de oxígeno se inserta y forma el grupo 17 α OH.

4. C₁₇- C₂₀ liasa.

Esta enzima requiere oxígeno molecular y NADPH+H⁺ habiéndose demostrado que utilizó 1 mol de O₂ por mol de 17 α -hidroxiprogesterona que sufre ruptura. Es importante señalar que la testosterona formada a partir de

progesterona por los microsomas testiculares en la presencia de $^{18}O_2$, re- tiene un átomo de ^{18}O en el grupo 17β -hidroxi; y este átomo es el oxígeno del grupo 17α -OH del intermediario 17α hidroxiprogesterona. (43)

5. 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Es la enzima responsable de la interconversión de androstendiona a - testosterona cataliza la reacción reversible favoreciendo la forma reducida (testosterona) a pH 7.4 y $25^\circ C$. El cofactor preferencial es $NADPH+H^+$ y los niveles relativos de la forma oxidada y reducida del nucleótido tienen influencia en el equilibrio alcanzado. La enzima es estimulada por citrato y en testículo de rata sus niveles son bajos (44) (45).

MATERIAL Y METODOS

1.- Material biológico.

Testículos de bovino con peso entre 200 y 300 g. obtenidos frescos en el lapso de una a dos horas después de sacrificado.

2. Material químico.

Nicotinamida adenin dinucleotido reducido (NADH); nicotinamida adenin dinucleotido fosfato reducido (NADPH); Ditiotreitól; 4 - pregnen - 3,20 diona (progesterona); $3,17\alpha$ dihidroxi-1,3,5 (10) estratieno (17α -estradiól) 1,3 5[10]-estratieno-3, 17β diól (17β -estradiól); 1,3,5 [10] estratien-3-ol-

17 ona (estróna); p-nitrofenil acetato; Azul de Coomassie R250; Sephacryl - S300; tetrazolio nitro-azul y fenacina metosufato fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

- 17 α -hidroxiprogesteróna (4-pregnen-17 α -ol-3,20 dion), 17 α ,20 α -dihidroxi 4-pregnene-3-óna y demás esteroides se obtuvieron de Steraloids Inc., Wilton N.H., USA.

- Acrilamida; N,N,N',N' - tetrametiletilendiamina; N,N'-metil bis acrilamida; persulfato de amonio, dodecil sulfato de sodio (SDS); Triglicina y estándares para peso molecular se obtuvieron de Bio-Rad Lab.

- El gel AcA-34 fué de LKB. El estuche para calibración de pesos moleculares se obtuvo de Pharmacia.

- La [4-¹⁴C] progesteróna (57 m Ci/mmol) y la [4-¹⁴C] 17 α -hidroxiprogesteróna (50 m Ci/mmol) fueron comprados a New England Nuclear.

- La [4-¹⁴C] estróna (55 m Ci/mmol); [1 α 2 α (n)-³H] corticosteróna (42 Ci/mmol) y [1,2,6,7,(n) -³H] androstendion (90 Ci/mmol) se obtuvieron de Amersham. El tubo de diálisis (espectrapor No. 2) fue adquirido de Fisher. El agua utilizada para todo el procedimiento fue bidestilada y desionizada.

3. Verificación de pureza.

- La comprobación de pureza de esteroides fríos y radiactivos se reali-

z6 por cromatografía en capa fina. Se disolvieron en etanol a una concentración de 7.5 $\mu\text{mol/ml}$.

4. Ensayo enzimático.

- La actividad enzimática se midió por la formación de 17 α ,20 α -dihidroxi-4 pregnen-3ona radiactivo a partir de [4- ^{14}C]-17 α -hidroxiprogesterona.

El volumen total de la mezcla de ensayo fue de 1.0 ml, el cual contenía 0.15 μmol de esteroide, 0.5 μmol de NADPH+H $^+$ en 0.1 M de buffer fosfato de sodio, a pH 7.2 con 10 mM de cisteína. También se realizaron ensayos con NADH+H $^+$. Una vez agregada la enzima, (2.5 mIU), las muestras se incubaron durante 15 min a 37°C.

La reacción se dió por terminada al efectuar la extracción con 10 ml de cloruro de metileno. Luego la fase orgánica se evaporó con nitr6geno y el residuo se disolvi6 en 50 μl de etanol.

5. Cromatografía en capa fina.

Las dimensiones de los cromatogramas fueron de 2x7 cm, en los cuales se coloca una alícuota de 10 μl . Se reveló con una mezcla de cloroformo-etil acetato-etanol (25:2:1), que separa adecuadamente el producto del sustrato. Posteriormente los cromatogramas se cortaron en pequeñas tiras de 0.5 cm. y se contó en 5 ml de líquido de centelleo, en un espectrofotómetro modelo Packard Tri-Carb. 3320. La eficiencia de la determinación radiactiva fue del 90% para ^{14}C y 50% para ^3H . La recuperación de la radiactividad

fue del 85%.

6. Cuantificación de proteína.

- Las concentraciones de proteína se determinaron inicialmente por el método de Lowry (46). Al comparar con otros (métodos) se concluyó que varios reactivos usados para el procedimiento de purificación interfieren con los de Lowry y Biuret principalmente, por lo cual se determinó la proteína con el método de Bradford (47), utilizando como estándar a la albúmina cristalina sérica bovina.

7. Definición de la actividad enzimática.

- Una unidad de actividad de 20α -hidroxisteroide deshidrogenasa (20α HED) se define como la cantidad de enzima que reduce $1\mu\text{mol}$ de la 17α -hidroxi-progesterona/min.

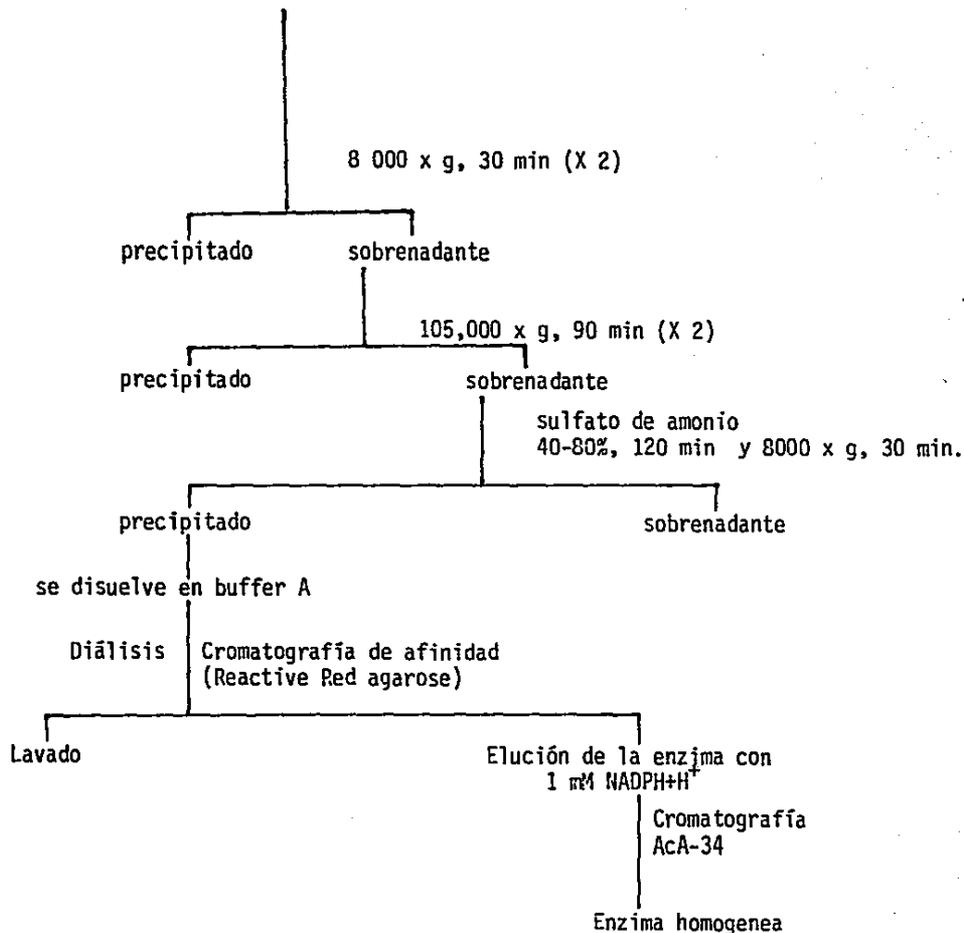
8. Esquema de purificación de la 20α -HED. Esq. 1

a) Homogenización de tejido.

- Todo el esquema de purificación se lleva a cabo a 4°C . Se colectaron del rastro dos testículos frescos de bovino, se transportaron al laboratorio en hielo. Se decapsulan cuidadosamente, su peso es de 450 g, primero se obtienen pequeños trozos manualmente. Se homogeniza en 0.01 M de buffer de fosfato de potasio, pH 7.2 que contiene 20% de glicerol y 1mM de ditiotretol, al cual llamamos Buffer A. La relación tejido testicular

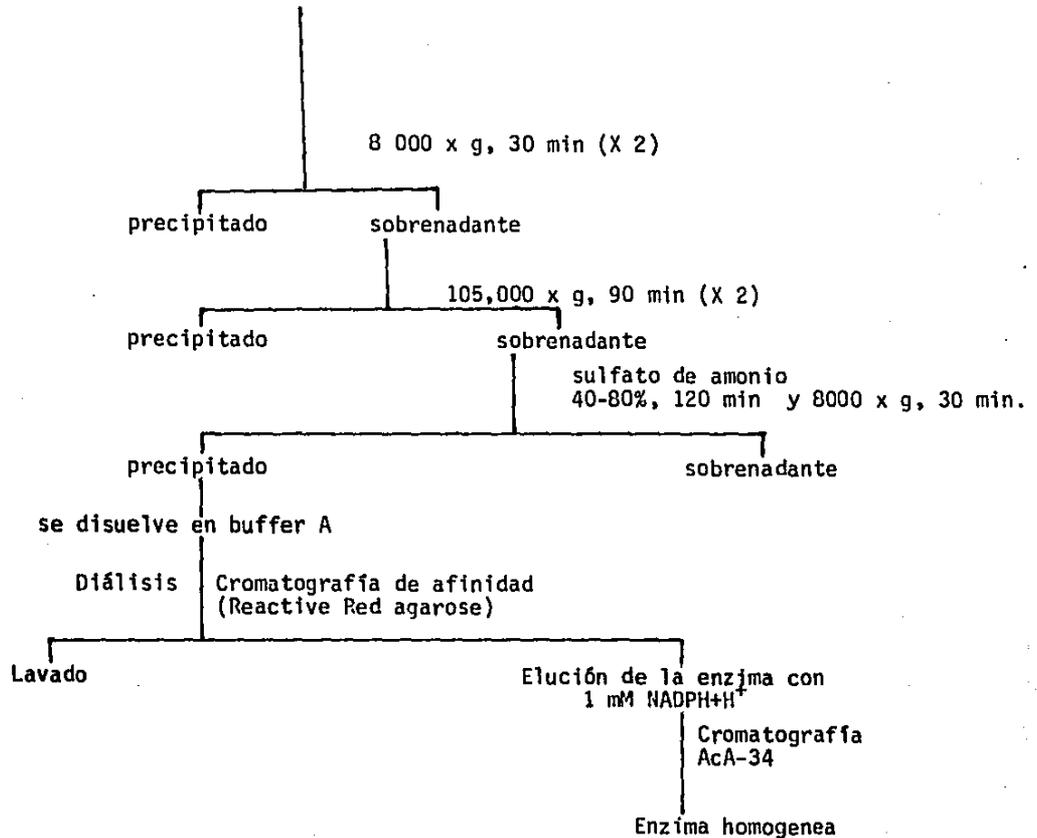
ESQUEMA DE PURIFICACION PARA LA 20 α -HEDH DE TESTICULO DE BOVINO

Testículos de bovino, homogenizados en 20% de glicerol,
buffer de fosfatos pH 7.2 (buffer A), 1mM DTT, 4°C



ESQUEMA DE PURIFICACION PARA LA 20 α -HEDH DE TESTICULO DE BOVINO

Testículos de bovino, homogenizados en 20% de glicerol,
buffer de fosfatos pH 7.2 (buffer A), 1mM DTT, 4°C



Esq. 1

buffer A fué de 1:1. La homogeneización se realizó en una licuadora Waring con 3 pulsos de 20 seg cada uno. Se lleva finalmente a un sistema de politrón Brinkman, con 3 pulsos de 30 sec cada uno, para obtener una homogenización más fina. El tiempo requerido en este proceso fué de 10-15 min. El pH del homogenado se ajusta a 7.2 con la adición de NaOH 1.0 N.

b) Centrifugación.

Se centrifuga el material obtenido en recipientes de plástico previamente calibrados y fríos, a 8000 x g por 30 min en 2 ocasiones (el sobrenadante se centrifugó una segunda vez). El precipitado se descarta. El sobrenadante se guarda en cuarto frío, para continuar al siguiente día con la centrifugación a 105,000 x g x 90 min, también en dos ocasiones; la capa de lípidos se descarta cuidadosamente con pipeta Pasteur. El sobrenadante obtenido se lleva a una saturación del 40% con sulfato de amonio, el pH se ajusta continuamente a 7.0...La mezcla obtenida se agita por dos horas en el cuarto frío, una vez terminada la adición del sulfato de amonio. Se centrifuga a 8000 x g por 30 min. El sobrenadante se lleva a 80% de saturación con sulfato de amonio y se vuelve a centrifugar como en el paso anterior. El precipitado obtenido después de la centrifugación se disuelve en buffer A en una relación de 1:2. Se observó que en la fracción 40-80% se recupera 70% o más de la actividad enzimática, con un incremento de aproximadamente 10 veces en la purificación. Posteriormente el material solubilizado se dializó por 48 hrs. con buffer A, a 4°C, incrementándose el volumen final del

dializado entre 10 y 20 ml. Detectamos que la enzima es estable por más de 8 semanas si se mantiene a 4°C.

9. Cromatografía.

- El material dializado se lleva a una columna de Reactive Red 120 agarose (4.5 μ mol de ligando/ml de gel) de las siguientes dimensiones: 1.8 x 52 cm. La velocidad de flujo fue de 3.0 ml/hr. Se lavó extensamente con buffer A, a un flujo de 7ml/hr (total 1070 ml).

La enzima se eluye con buffer A que contiene 1.0 mM de NADPH+H⁺. Las fracciones que tienen actividad de 20 α -HED son colectadas y se aplican a una columna de filtración en gel AcA-34, de 3x60 cm, y se eluyen con buffer A, 10 ml/hr.

10. Electroforesis.

- La electroforesis en disco se realizó por el método de Davis (48) a pH 7.0. La concentración de acrilamida en los geles fue de 7.5%. Se corrieron a 4 mA/tubo en una cámara Hoefer. Luego los geles se tiñeron con azul de Coomassie (49), después de haberse fijado en ácido tricloroacético al 12.5% (p/v) durante 1 hora. Un gel por duplicado fue teñido para observar la actividad de 20 α HED, por el método de zimografía de Karavolas y cols. (50).

Posteriormente, para determinar la estructura de subunidades y peso

molecular de la 20 α -HED de testículo de bovino, el ensayo se realizó por - electroforesis en SDS por el método descrito por Laemmli (51). Los geles se corrieron a 2 mA/tubo. La curva estándar de pesos moleculares se estableció al correr geles separados con fosforilasa B(92,500); albúmina de suero bovino (66,200); ovalbúmina (45,000); anhidrasa carbónica (31,000); inhibidor de tripsina de frijol de soya (21,500) y lisozima (14,400).

II. Determinación del peso molecular por filtración en gel.

- Para realizar este experimento se utilizó una columna de 2.1x90 cm de Sephacryl S-300. Se equilibró con buffer A. Se agregaron separadamente una mezcla de enzimas de peso molecular conocido como son: tiroglobulina, ferritina, catalasa, aldolasa, albúmina de suero bovino, ovalbumina, quimotripsinógeno A y ribonucleasa A. El V_0 (volumen de exclusión) se determinó por la elución de azul dextrán que fué de 50 ml. con una velocidad de flujo de 14 ml/hr. Los volúmenes de elución de los estándares se determinaron al monitorear la absorbancia a 280 nm. Finalmente, se aplicó a la columna una alicuota de 2.0 ml de la enzima 20 α -HED, obtenida de la columna de AcA-34, y con 0.44 mg protefna/ml. El volumen de elución se determinó al cuantificar la actividad enzimática en cada fracción.

RESULTADOS

1. Esquema de purificación de la 20 α -HEDH.

El esquema de los pasos de purificación se muestra en la tabla 1. Los cálculos matemáticos se relacionan a la actividad específica del sobrenadante de 8000 x g. Después de la centrifugación a 105,000 x g, el sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio, y la actividad enzimática se recuperó en la fracción 40-80% de saturación (ver métodos). Es algo notable de señalar que el precipitado obtenido de este paso, se suspende y dializa con buffer A más ditiotreitol; y de manera consistente en todas las preparaciones (n=12) se observó un incremento en la actividad total enzimática de aproximadamente el doble (de 424 a 1151mIU). Este hecho no es exclusivo para la 20 α -HED (12) (14) y se sugiere que el material inicial tiene inhibidores, los cuales son probablemente removidos durante el fraccionamiento o la diálisis.

Este esquema de purificación es primordialmente debido a la gran afinidad de la agarosa roja para deshidrogenasas dependientes de NADP⁺; ya que más del 90% de la enzima se une en 2 horas, y más del 70% de la actividad enzimática se recupera con 1.0 mM de cofactor. Además remueve el exceso de hemoglobina y esterases. En contraste, durante la experiencia inicial con la agarosa azul, se unió menos del 70% en más de 12 horas, y no se unió con ninguna concentración de cofactor ni con KCl de 1-3 M, y además su alta afinidad por deshidrogenasas dependientes de NAD⁺.

Se obtuvieron purificaciones óptimas con una relación de muestra/gel de 2:1, y una concentración de proteína de 20-30 mg/ml de muestra. La columna,

PURIFICACION DE 20 α -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA DE TESTICULO DE BOVINO

MUESTRA	mU	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mU/mg)	PURIFICACION	RECUPERACION (%)
Sobrenadante 8000 g	424	50,490	0.008		
Sobrenadante 105,000 g	343	18,550	0.018	2.3	81
Sulfato de amonio 40-80%	1,151	4,050	0.28	35	272
Cromatografía de afinidad	758	16.4	46.3	5792	178
(Reactive Red agarosa)	(601)*	(8.2)	(73)	(9125)	(141)
AcA-34	289	2.5	115	14375	68

* () Estos valores representan la elución del pico enzimático usado en la cromatografía de filtración.

TABLA 1

una vez empacada, se cargó con el dializado y se eluyó a una velocidad de 3ml/hr, de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente. La mejor recuperación se obtuvo cuando la enzima se eluyó con 1.0 mM de NADPH+H⁺ en buffer A.

Los dos testículos de bovino utilizados en este esquema, tienen un peso de 450 g, y contiene 450 mIU de actividad enzimática. La presencia de glicerol en el buffer de homogenización es esencial para estabilizar la actividad. Cuando no se usó, se perdió el 80-90% de la actividad de 20αHED dentro de las siguientes 48 hr.

2. Localización subcelular.

El fraccionamiento celular reveló que el 85-90% de la actividad enzimática se localiza en el sobrenadante. Una distribución subcelular similar se ha descrito para la 20αHEDH de rata y de puerco. (41)

3. Recuperación de la 20α HEDH.

La enzima se recuperó al eluirla con el cofactor, el resultado se muestra en la fig. 1, donde más del 70% de la actividad de la 20α-HED fue retenida en la columna de agarosa y eluída abruptamente cuando se agregó el buffer A que contenía 1.0 mM de NADPH+H⁺

La cantidad total de la actividad enzimática eluída con NADPH+H⁺, representa el 76% de la, inicialmente agregada a la columna.

Cuando se utilizó NAD⁺ en la elución a concentraciones de 0.5, 0.2 y .

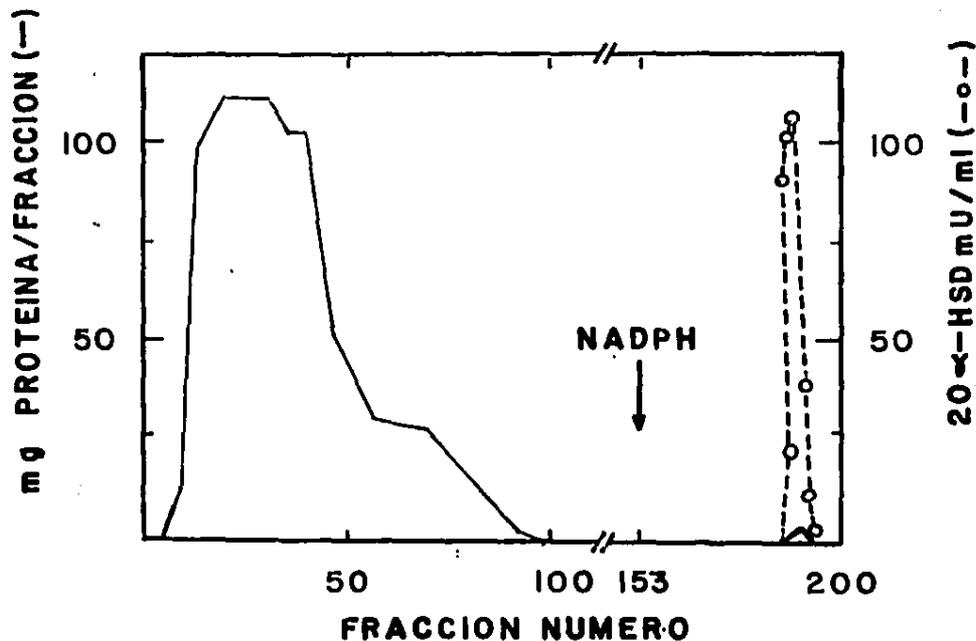


Fig. 1

Cromatografía de afinidad de la 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa con Reactive red agarose. El dializado (148 ml con 27.2 mg/ml de proteína y 7.7mU/ml de enzima), se aplicó al gel, se lavó con buffer A (1070 ml). La elución se realizó con NADPH+H⁺ 1 ml. Las fracciones 154 a 200 corresponden a 2 ml cada una.

0.1 mM se obtuvieron recuperaciones entre el 30-20%. Y cuando se utilizó - 17 α -hidroxiprogesterona 0.1 mM en el buffer A, no se detectó actividad. Pero cuando se mezcló la misma concentración de esteroide (0.1 mM de 17 α -OH prog.) con 0.1 mM de NADP+, también en buffer A, el resultado fue que la actividad específica es mayor que con 1.0 mM NADPH+H⁺, pero su recuperación fue menor (<48%).

La agarosa roja permitió una purificación de 268 veces con relación al anterior. El siguiente paso fue la cromatografía de las fracciones obtenidas de la agarosa roja con la más alta actividad específica (entre paréntesis en la tabla 1), las cuales se colocaron en una columna de filtración AcA-34. La actividad específica final fue de 115 mIU/mg. con una recuperación total del 68%.

4.- 20 α HED homogénea.

La enzima eluida de la columna de filtración en gel, se revela homogénea de acuerdo a estudios electroforéticos en gel de poliacrilamida. Se ensayaron duplicados para actividad de 20 α -HED a pH 8.5. La banda activa correspondió a la banda de proteína teñida de la preparación homogénea. (Fig. 2)

5.- Determinación del peso molecular.

Se realizó la electroforesis con SDS y la enzima mostró una sola banda que corresponde a 40,000 de peso molecular (Fig.3), de acuerdo a un promedio de tres determinaciones. Luego se aplicó una alícuota de la enzima a la co-



Fig. 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida de 20α -HEDI a pH 7.0. Los geles de la izquierda y el centro corresponden a material eluido de Reactive red agarose; teñido por zimografía con 17α , 20α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona como sustrato y cor. azul de coomassie respectivamente. El gel de la derecha representa a la enzima eluida de la columna de ACA-34 y teñida con azul de coomassie.

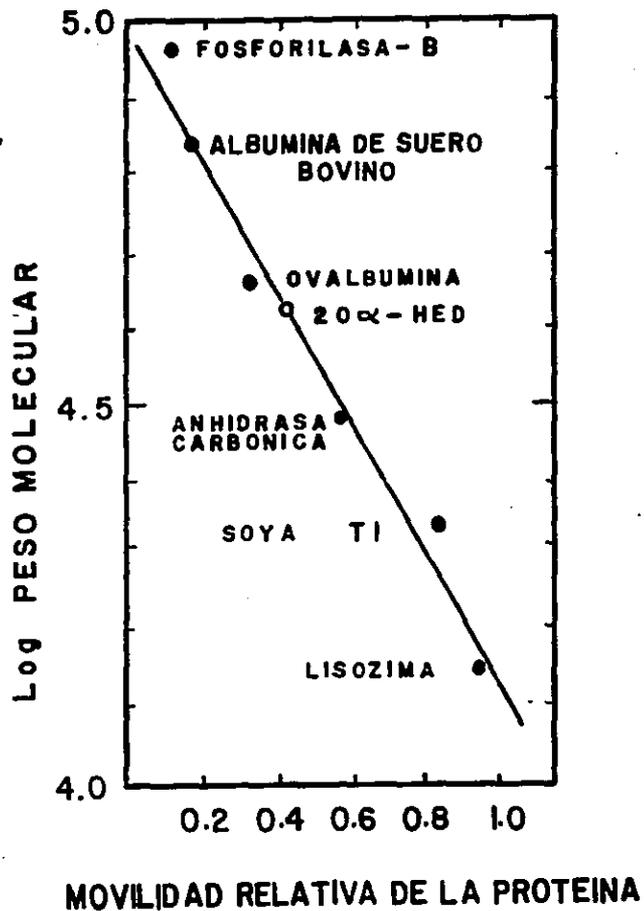


Fig. 3

Determinación del peso molecular de la 20 α -HEDH por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS a pH 8.3, cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

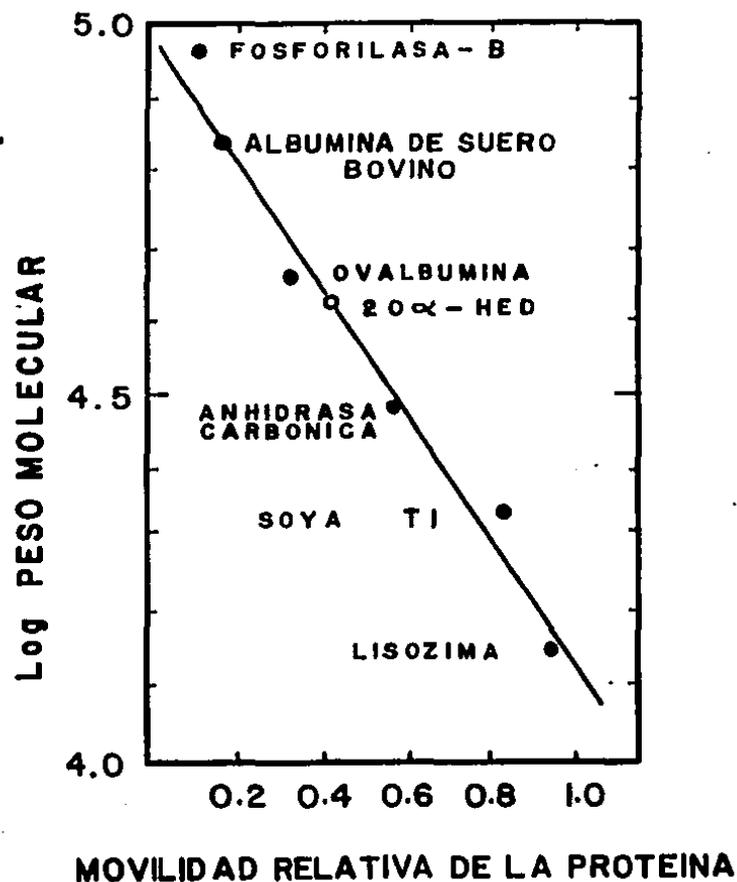


Fig. 3

Determinación del peso molecular de la 20 α -HEDH por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS a pH 8.3, cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

lumna de Sephacryl S-300, calibrada previamente con los estándares adecuados. La enzima tuvo un peso molecular de 34,000, en tres determinaciones. Este valor concuerda con el valor obtenido con SDS, y en conjunto los datos indican que la 20 α HED no tiene subunidades. (Fig. 4)

6.- pH óptimo de la enzima.

Se observó la modificación de la velocidad de producción del esteroide reducido al variar el pH del buffer fosfato entre 4.6 y 9.2, ya sea en la presencia de NADH+H⁺ o NADPH+H⁺. Con NADPH+H⁺ como cofactor la velocidad máxima de la actividad enzimática se observó a pH 5.6 y con NADH+H⁺ la enzima mostró un amplio pH óptimo que varió entre 6.8 y 8.4 (Fig. 5).

7.- Especificidad del cofactor y el sustrato.

La determinación de la Km para la 20 α HED se realizó con concentraciones variables de 17 α -hidroxiprogesterona manteniendo la de NADPH+H⁺ en 0.5 μ M. Las mezclas de reacción contenían 2.3 mIU de enzima y las velocidades de reacción se cuantificaron por la generación de 17 α ,20 α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona. Cada punto de la gráfica corresponde a 8 determinaciones.

El valor de la Km a pH 7.0 determinado por dobles recíprocas fue de 7.3 x 10⁻⁵ M. La inhibición por sustrato se observó en forma reproducible cuando la concentración fue mayor de 0.3 μ M. Cuando la 20 α -HED se incubó con 17 α -hidroxiprogesterona en la presencia de 0.5 μ M de NADH+H⁺, la velocidad de reacción fue menor al 30% en relación a la observada con la misma concentración de

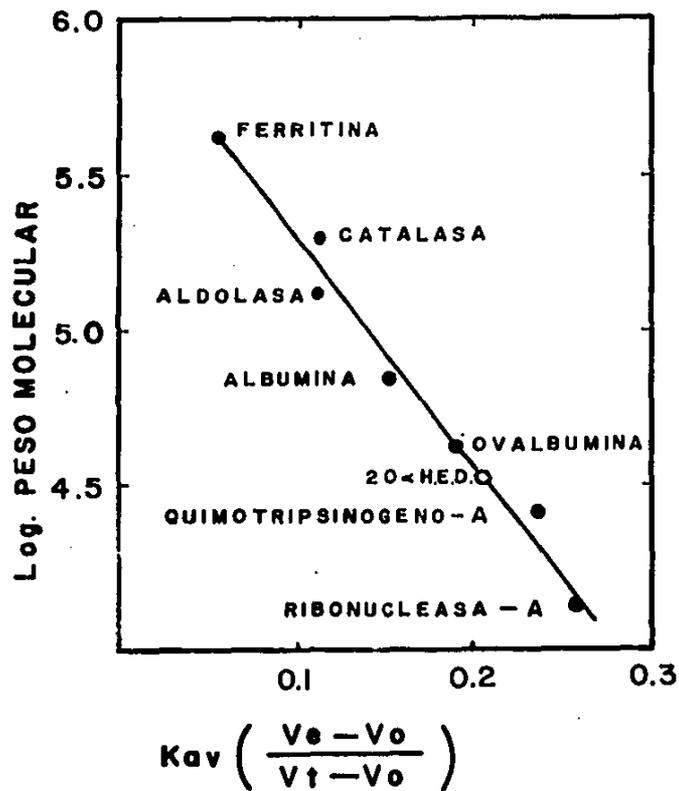


Fig. 4

Determinación del peso molecular por filtración en gel con Sephacryl S-300 (columna de 2.1 x 90 cm). La enzima y las proteínas se colocaron en la columna por separado, se eluyó con buffer A a 14 ml/hr, se observó la absorbancia a 280 nm. El V_o se determinó con azul dextran. El volumen de elución se determinó para cada proteína.

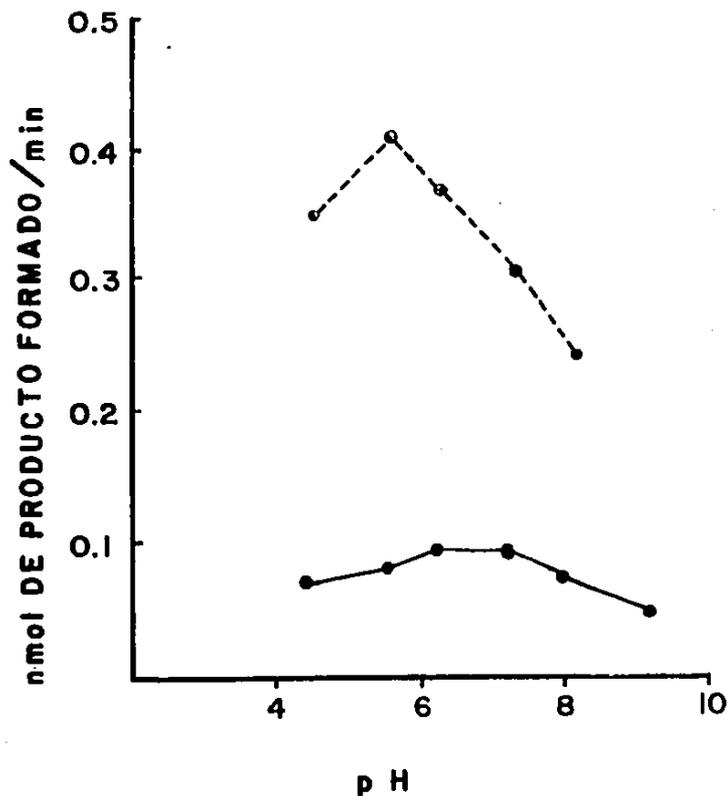


Fig. 5

pH óptimo para la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. El ensayo se realizó con buffer fosfatos 0.01M y con un pH que varió entre 4.6 y 9.2, utilizando como cofactores NADPH+H⁺ (o) arriba y NADH+H⁺ (●) abajo.

NADPH+H.⁺ (Fig. 6)

La androstendiona, estrona y corticosterona no son sustratos para la 20 α -HED de testículo de bovino.

La actividad de la 20 α -HED utilizando a la progesterona como sustrato fue menos de 1% que la observada con 17 α -hidroxiprogesterona como sustrato. (tabla 2).

DISCUSION

La compartimentalización enzimática, para la formación de hormonas esteroideas, tiene relevancia desde el punto de vista funcional, estructural y evolutivo. La formación de testosterona requiere de la enzima P 450 scc (side chain cleavage) o 20-22 liasa, de localización mitocondrial, es la primera enzima de la biosíntesis y reguladora importante desde el punto de vista hormonal (52)(53)(54)(55)(56)(57). El resto de enzimas testiculares relacionadas a la transferencia de esteroides están unidas a microsomas.

Estudios de Fevold y cols (58) sobre la actividad de la 20 α HEDH de testículo de pájaros indica una localización en elementos celulares de los túbulos seminíferos y sus niveles se incrementan, de acuerdo al aumento en el tamaño testicular, de 1.57 a 36.7 nmol de enzima/tejido testículo/hr, con peso testicular de 7.2 a 480 mg respectivamente, y sugieren la participación

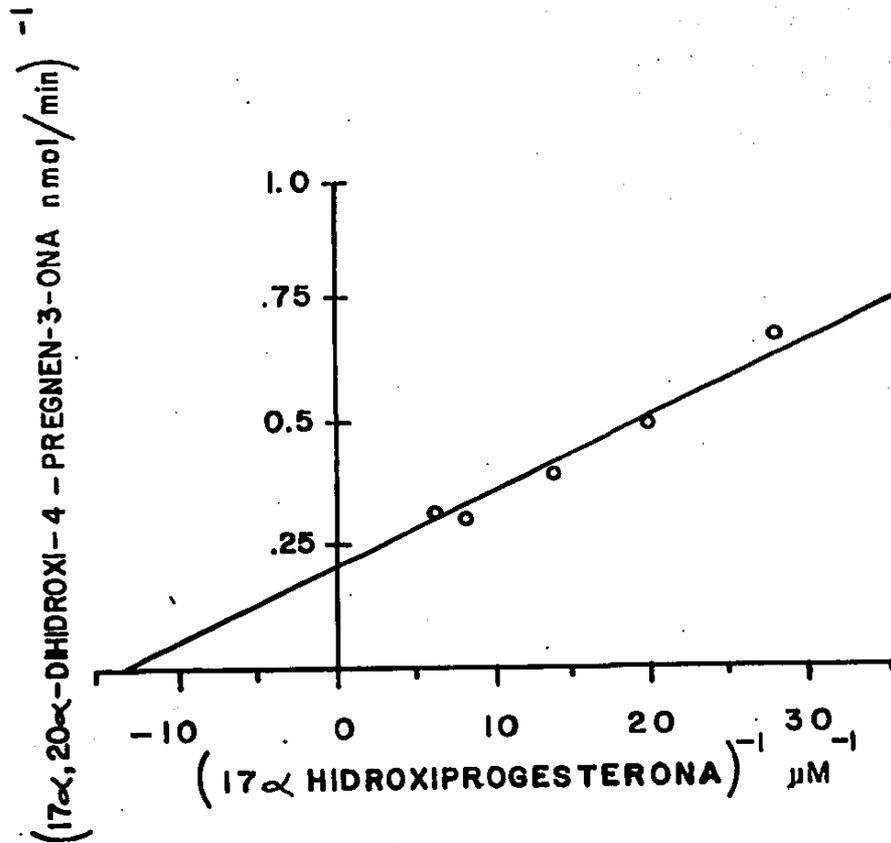


Fig. 6

Determinación de la K_m aparente para 20α -hidroxisteroide deshidrogenasa con 17α -hidroxiprogesterona como sustrato y $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ($0.5\mu\text{M}$) como cofactor. Cada ensayo tiene 2.3mIU de enzima y la velocidad de la reacción se cuantificó por la producción de $17\alpha, 20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3ona. Cada punto representa el promedio de 8 determinaciones.

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO PARA LA 20 α -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA

TIEMPO	SUSTRATO	N MOL PRODUCTO FORMADO/MIN 2.5 U*	5.2 U*	%	SISTEMA DE SEPARACION
15'	17 α -hidroxiprogesterona	117.8	‡	100%	clorof/etilacet/etanol
15'	progesterona	NSD ⁺	NSD	0%	clorof/etilacet/etanol.
	estradiol	NSD	NSD	0%	clorof/etilacet/etanol
	androstendiona	NSD	NSD	0%	clorof/etilacet/etanol
30'	progesterona	0.15	0.40	0.12-0.33%	clorof/etilacet/etanol
	progesterona	0.15	0.72	0.12-0.61%	benceno/etanol
	androstendiona	NSD	NSD	0%	benceno/etil acetato
	estronea	NSD	NSD	0%	benceno/etanol
	corticosterona	NSD	NSD	0%	benceno/etanol
	corticosterona	NSD	NSD	0%	cloroformo/acetona
	estronea	NSD	NSD	0%	cloroformo/acetona

* 2.5 y 5.2 unidades de enzima/ensayo.

+ NSD = no se detectó.

‡ = no se hizo el ensayo con 5.2U

TABLA 2

de esta enzima en la función espermatogénica de testículo de pájaro.

El papel fisiológico de la 20α -HEDH y la importancia de la reacción reductora para formar $17\alpha 20\alpha$ -dihidroxi-pregnen-3-ona son desconocidos. Las siguientes observaciones obtenidas en testículo de bovino nos pueden sugerir interpretaciones diferentes. La enzima se localiza principalmente en la fracción soluble, mientras que la mayoría de las enzimas testiculares que se relacionan a la transformación de esteroides, están localizadas en mitocondria y microsomas (59)(60)(61)(62). En este caso el beneficio desde el punto de vista funcional es la existencia de un estado de gran ordenamiento estructural que reduce el tiempo de difusión del sustrato y que impide la pérdida de intermediarios biosintéticos del complejo membrana-enzima.

La enzima tiene una alta especificidad por su sustrato, la 17α -hidroxiprogesterona. Willmer (63) enfatiza la importancia de los grupos C-3 y C-17 para la acción fisiológica de los esteroides en la membrana.

Existen también evidencias desde el punto de vista químico de que la conformación del anillo A/B tiene importancia en metabolitos de la progesterona, como las 5α -progestinas, que actúan principalmente en el genoma y esta conformación puede contribuir a mecanismos tan complejos como el control hormonal. (64)

El equilibrio de la reacción enzimática favorece la formación del compuesto dihidroxilado ($17\alpha 20\alpha$ -dihidroxi 4-pregnen-3-ona) aun en presencia

de un exceso de cofactor oxidado. La disminución en la formación del dihidroxiesteroide al incrementar el pH parece ser debido a la escasa participación del ion hidrógeno. Y la presencia del cofactor reducido ($\text{NADPH}+\text{H}^+$) a un pH óptimo de 5.6, favorece la formación del producto (dihidroxi-esteroide) bajo estas condiciones de ensayo. (65)

En base a la literatura es un hecho conocido que las deshidrogenasas de esteroides catalizan la interconversión reversible de grupos hidroxilo y carbonilo. Y el pH óptimo de la reacción de oxidación es muy diferente de la reacción de reducción (66) (67).

Desde el punto de vista químico, la explicación a que se esté favoreciendo la reducción de la $17\alpha\text{-OH}$ -progesterona, puede ser que se genera una carga parcial positiva del grupo carbonilo en la posición 20 de esta molécula. Además la formación de un puente de hidrógeno, entre el grupo carbonilo del C-20 y el grupo hidroxilo adyacente estabiliza la polarización del grupo carbonilo. Mientras que el compuesto dihidroxilado carece de este tipo de polarización. Estos aspectos pueden jugar un papel importante en la interacción del sustrato y la enzima; y es probable que este puente de hidrógeno se relacione a la reacción reductora por la diferencia en el pH óptimo entre las dos reacciones.

Reportes en la literatura de estudios en testículos de pájaros, irradiados con rayos x, indican que se produce un estado regresivo del tejido

conectivo intersticial (18). Mientras que en el testículo de rata, la actividad de la 20- α HEDH permanece intacta a pesar de la ausencia de espermatogénesis post-irradiación (68) (69). Estos datos sugieren que la enzima se relaciona a la producción de andrógenos. Por las características de la 20 α -HEDH de testículo de bovino se sugiere que, desde el punto de vista bioquímico, disminuye la formación de andrógenos por dos mecanismos: a) Porque reduce el sustrato de la enzima 17-20 liasa (17 α -hidroxiprogesterona) y - b) porque cataliza la producción de un inhibidor de la misma 17-20 liasa (17 α 20 α dihidroxi 4-pregnen 3 ona).

Además, existen semejanzas en la 20 α HEDH testicular de rata, (69) puerco (70) y bovino (65): en la especificidad de sustrato, son enzimas solubles, el cofactor preferente es NADPH+H⁺, son enzimas monoméricas con peso molecular de 34,000 daltones; estas características que comparten, indican una interesante observación desde el punto de vista evolutivo.

La espermatogénesis es regulada hormonalmente por diversos compuestos proteicos como la hormona estimulante del folículo (FSH) que estimula la proliferación de células espermatogénicas; hormona luteinizante (LH) que estimula directamente a las células de Leydig; la prolactina (PRL) que parece incrementar la sensibilidad de los testículos a LH (71). Es de reciente interés el conocimiento de que la testosterona y la progesterona participan en actividades enzimáticas de conversión de esteroides a través de la 5 α -reduc-

tasa y 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa en el sistema nervioso central - (72) (73) (74). Los efectos producidos en este tejido tienen por lo tanto, una relación directa con la liberación de gonadotropinas (75) (76) (77) (78). Los estudios de la aplicación intrahipotalámica de testosterona y dihidrotestosterona (DHT) revelan una disminución en la liberación de LH pero al colocar 5α -androstan- 3α , 17β -diol (5α , 3α diol) produce un efecto inhibitorio en la secreción de LH. Cuando la administración de esteroides (testosterona y DHT) es en adenohipofisis no se afecta la liberación de LH. Por otro lado la testosterona y sus metabolitos tienen efecto estimulador sobre la hormona estimulante del folículo (FSH), tanto a nivel hipotalámico como en pituitaria anterior. Estos datos señalan que los andrógenos a través de la vía 5α -reductasa ejercen un efecto de retroalimentación positivo sobre la secreción de FSH, tanto a nivel hipotalámico como en pituitaria y tienen un efecto de retroalimentación negativo sobre la secreción de LH solo a nivel de hipotálamo (79) (80) (81).

Por otro lado sabemos que la progesterona y dihidroprogesterona ejercen un efecto estimulador en la liberación de LH; mientras que la de FSH no se modificó. La 5α -pregnan- 3α -ol-20 ona (3α ol) y la 5α -pregnan- 3β ol-20 ona (3β ol) son eficaces liberadoras de FSH, mientras que no modifican los niveles séricos de LH. También sabemos que los derivados 3α ó 3β ol son potentes liberadores de FSH y no tienen efecto estimulador sobre LH (82) (83) (84).

Las evidencias de Kalra y Cols (85) sugieren que el SNC es el sitio de

acción de la progesterona, ya que es capaz de aumentar los niveles de LH y FSH en animales hembras castrados, con implantaciones en diversas áreas del cerebro especialmente el área preóptica anterior y el núcleo amigdalino. Otros investigadores han reportado receptores de progesterona en hipotálamo (86) (87) (88). Lo anterior revela que la liberación de gonodotropinas puede tener mecanismos de control diferentes.

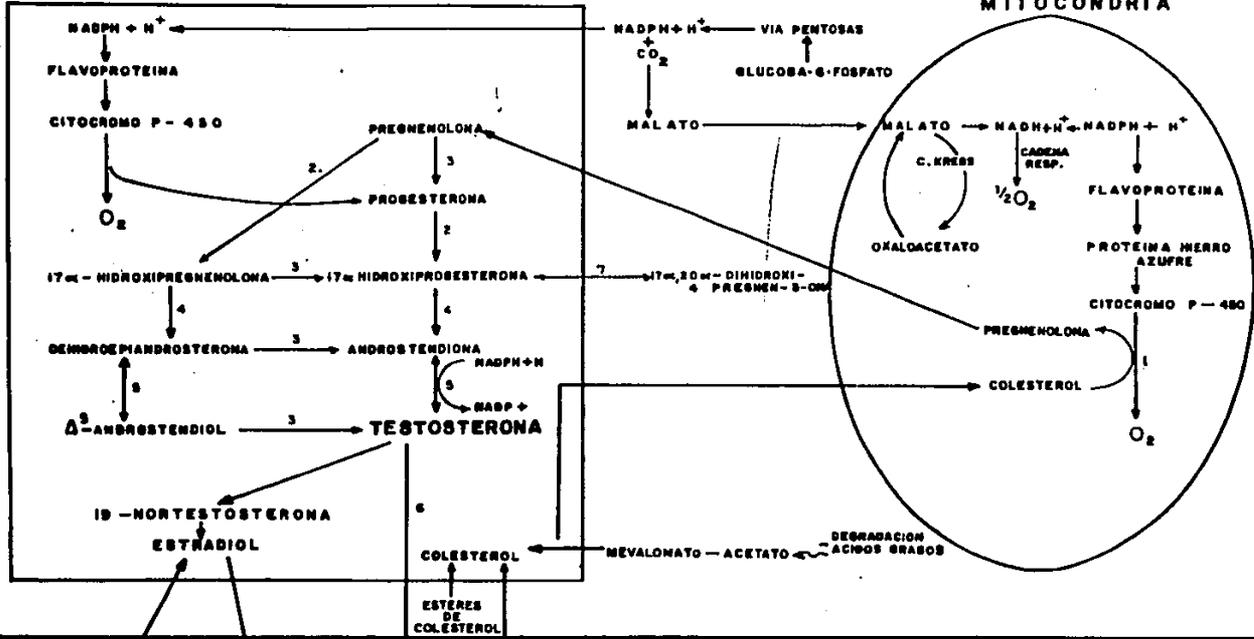
Existen una serie de evidencias sobre el metabolismo de esteroides, y a pesar de intentos por lograr una integración y comprensión fisiológica, el mecanismo de acción de la 20α -HEDH no se conoce, aunque, actualmente la investigación sobre biosíntesis de esteroides revela aspectos fundamentales, pues la 20-22 liasa (P 450 scc), la enzima limitante que convierte colesterol en pregnenolona; es codificada por un solo gene en el humano.

Por todo lo anterior es interesante tratar de entender el papel biológico de la 20α -HEDH de testículo de mamífero y su localización citoplásmica que se relaciona a la función.

CELULA DE LEYDIG

RETICULO ENDOP. LISO

MITOCONDRIA



DIHIDROTESTOSTERONA

- 1-20,2-ELIASA P450 SCC.
- 2-17 α -HIDROXILASA.
- 3-17 α -3 β -OH E. DN., Δ^5 ISOMERASA.
- 4-17,20, LIASA.
- 5-17 β -OH E. DN.
- 6-5 α -REDUCTASA.
- 7-20 α -OH E. DN.

BIBLIOGRAFIA

1. Mori, H., and Christensen, A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat tests. *J. Cell Biol.* 84:340-354. 1980
2. Kaler, L.W. and Neaves, W.B. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat. Rec.* 192:513-518. 1978
3. Brown, M.S. and Goldstein J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191:150-154, 1976.
4. Ewing, L.L., and Brown, B. In "The Testis" (A.D. Johnson and W.R. Gomes eds), chap. 7. p. 239-287. Acad. Press New York 1977.
5. Ewing L.L., Cochran, R.C., Zirkin, B., and Chubb, C.E. In "Testicular development, structure and function" (A. Steinberger and E. Steinberger, eds). p. 117-127 Raven, New York, 1980.
6. Chubb, C. and Ewing, L.L. Steroid secretion by in vitro perfused testes: secretions of rabbit and rat testes. *Am J. Physiol.* 237: E231-E238. 1979.
7. Hall, P.E. In "Endocrinology" (L.J. De Groot, G.F. Cahill, Jr., eds. p. 1511-1520 Grune and Stratton, New York, 1979.
8. Zirkin, B.R., Ewing, L.L., Kromann, and Cochran, R.C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107: 1867-1874, 1980.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

9. Janszen, F.H.A., Cooke, B.A., Van Driel, M.J.A. and Vander Molen H.J. The effect of lotropin on specific protein synthesis in tumour Leydig cells and in Leydig cells from immature rats. *Biochem. J.* 172: 147-153. 1978.
10. Cooke, B.A., Lindh, M.L., and Janszen, F.H.A. Effect of lotropin on phosphorylation of endogenous proteins in testis leydig cells. *Biochem J.* 168:43-48. 1977.
11. Toren, D., Menon, K.M.J., Forchielli, E., and Dorfman, R.I. In vitro enzymatic cleavage of the cholesterol side-chain in rat testis preparations. *Steroids* 3:381-386. 1964.
12. Nancarrow C.D., Sharaf, M.A. and Sweet F. Purifications of 20α -hydroxysteroid oxido reductase from bovine fetal erythrocytes. *Steroids* 37:539-553. 1981.
13. Murdock, G.L., Chin C.C., and Warren J.C. Human placental stradiol 17β -deshydrogenase. *J. Biol. Chem.* 258: 11460-11464. 1983.
14. Henderson, L.L. and Warren, J.C. Purification and characterization of epimeric estradiol dehydrogenases (17α and 17β) from equine placenta. *Biochemistry* 23:486-491. 1984.
15. Chin C.C. and Warren J.C. Crystalization of human placental estradiol 17β -dehydrogenase: a new method for crystallizing labile enzymes *J. Biol. Chem.* 251:3700-3705. 1976.
16. Recknagel, R.O. Adrenocortical steroid C-20-keto reductase *J. Biol.*

Chem. 227:273-284. 1957.

17. Wiest, W.G., and Wilcox R.B. Purification and properties of rat ovarian 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. J. Biol. Chem. 236: 2425-2428. 1961.
18. Fevold, H.R., and Eik-Nes, K.B. Progesterone metabolism by testicular tissue of the English sparrow (*Passer domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 2:506-512, 1962.
19. Matthijssen; C., Mandel, J.E., and Seiden, D.T. Separation of a purified adrenal 20α -hydroxysteroid dehydrogenases. Biochem Biophys Acta 89: 363-364. 1964.
20. Purdy, R.H., Halla, M., and Little, B. 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activity a function of human placental 17β -hydroxysteroid dehydrogenase. Biochem. Biophys Acta 89: 557-560. 1964.
21. Dorfman, R.I. In "Proc. 9th. Ann. Meeting Pacific Coast Fertility Soc. Palm Springs Cal. p. 51. 1961.
22. Slaun white, W.R., Jr., and Samuels, L.T. Progesterone as a precursor of testicular androgens. J. Biol. Chem. 220: 341-345. 1956.
23. Savard, K., Masan, N.R., Ingram, J.T., and Gassner, F.X. The androgens of bovine spermatic venous blood. Endocrinology 69: 324-329. 1961
24. Goldstein, M. Gut, M., and Dorfman, R.I. Conversion of pregnenolona to dehydroepiandrosterone. Biochem Biophys Acta 38:190 -1, 1960.

25. Burstein, S., Kimball, H.L., Chaudhuri, N.K., and Gut, M. Metabolism of 17α , 20α -dihydroxycholesterol and 17α , 20β -dihydroxy- 20 -iso-cholesterol by guinea pig adrenal preparations. J. Biol. Chem. 243: 4417-4421. 1968
26. Solomon, S., Carter, A.C., and Lieberman, S. The conversion in vivo of 17α -hydroxypregnenolone to dehydroisoandrosterone and other 17-ketosteroids. J. Biol. Chem. 235:351. 1960
27. Neher, R., and Wettstein, A. Occurrence of Δ^5 - 3β -hydroxysteroids in adrenal and testicular tissue. Acta endocrinol 35: 1-12. 1960
28. Gual, C., Lemus, A.E., Kline, I.T., Gut, M., and Dorfman, R.I. Biosynthesis of dehydroepiandrosterone in a patient with a virilizing adenoma. J. Clin Endoc. and Metabolism. 22: 1193-1195. 1962
29. Finkelstein, M., Forchielli, E., and Dorfman, R.I. Estimation of testosterone in human plasma. J. Clin Endocrinol and Metabolism 21: 98-100. 1961.
30. Prelog, V., and Ruzicka, L. Untersuchungen über organextrakte Mitleilung. Über zivei moschufartig reichende steroide aus schweine testesextrakter. Helv. Chim. Acta 27: 61-66. 1944
31. Brooksbank, B.W.L., and Haslewood, G.A.D. The estimation of androst - 16 - en - 3α -ol in human urine. Biochem. J. 80:488-490. 1961
32. Mason, H.L., and Schneider, J.J. Isolation of Δ^{16} -androst-3(α)-ol from the urine of women with adrenal cortical tumors. J. Biol. Chem. 184:593-598. 1950
33. Dorfman, R.I., Forchielli, E., and Gut, M. Androgen biosynthesis

- and related studies. *Rec. Prog. Hor. Res.* 19:251-255. 1963
34. Miller, A.M., Rosenkrantz, H., and Dorfman, R.I. Unsaturated compounds in human urines. *Endocrinology* 53:238-239. 1953.
 35. Toren, D., Menon, K.M.J., Forchielli, E., and Dorfman, R.I. In vitro enzymatic cleavage of the cholesterol side-chain in rat testis preparations. *Steroids* 3:381-386. 1964.
 36. Hall, P.F., and Koritz, S.B. The conversion of cholesterol and 20 - hydroxycholesterol to steroids by acetone powder of particles from bovine corpus luteum. *Biochem* 3:129-135. 1964
 37. Omura, T., Sanders, E. Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. Isolation from adrenal cortex of a new heme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridin nucleotide cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 117:660-668. 1966
 38. Samuels, L.T. Studies of the enzymes involved in the synthesis and degradation of the hormones of the adrenal gland. *Ciba Found. Coloq. Endocrinol* 7: 176-186. 1953.
 39. Marcus, P.I., and Talalay, P. Induction and purification of α and β hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 218:661-666. 1956
 40. Rubin, B.L. and Dorfman, R.I. Quantitative assay of the 3 β ol-dehydrogenase system in whole adrenal homogenate. *Endocrinology* 66:601-609. 1957
 41. Shikita, M., and Tamaoki, B. Testosterone formation by subcellular particles of rat testes. *Endocrinology* 76:563-570. 1965
 42. Samuels, L.T. Metabolism of steroid hormones. In "Metabolic Path-

ways" (D.M. Greenberg, ed.). Vol. 1. 2nd ed. ch. 11 p. 431-440. Acad. Press. New York.

43. Lynn, W.S., Jr., and Brown, R.H. The conversion of progesterone to androgens by testes. *J. Biol. Chem.* 232: 1015-1022. 1958
44. Samuels, L.T., and Matsumoto K. influence of steroid distribution between microsomes and soluble fraction on steroid metabolism by microsomal enzymes. *Endocrinology* 86:402-415, 1969.
45. Yanagibashi, K., and Hall, P.F. Role of electron transport in the regulation of the lyase activity of C21 side-chain cleavage P-450 from porcine adrenal and testicular microsomes. *J. Biol. Chem.* 261:8429-8433, 1986.
46. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1951
47. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem* 72:248-254. 1976
48. Davis, B.J. Method and application to human serum proteins. *Disc. electrophoresis II. Ann. N.Y. Acad Sci.* 121:404-427. 1964
49. Bertoleni M.J., Tankersley D.L., and Schroeder, D.D. Staining and destaining polyacrylamide gels: a comparison of coomassie blue and fast green protein dyes. *Analyt. Biochem* 71:6-13. 1976
50. Karavolas, H.K., Baedeker M.L., and Engel L.L. Human placental 17 β -estradiol dehydrogenase *J. Biol. Chem.* 245:4948-4952 1970.

51. Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-685. 1970
52. Omura T., Sato R., Cooper D. Y. Rosenthal O. Estabrook R. W. Function of cytochrome P450 of microsomes. *Fed Proc.* 24:1181-1185, 1965.
53. Katagiri, M., Takemoni, S., Itageki, E. Suhara K. Gomi, T., Sato R. Characterization of purified cytochrome P450 scc and P450 11 β from bovine adrenal mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 74:281:285, 1976
54. Simpson E.R. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 13:213-218, 1979.
55. Nakajin, S. Shinoda M, Haniu M, Shively J.E., Hall P.F. C₂₁ steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes. Purification and characterization of the 17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 259:3971-3977, 1984.
56. White, R.E. and Coon, M.J. Oxygen activation by cytochrome P450. *Ann Rev. Biochem* 49:315-356, 1980.
57. Gibbons G.F. and Mitropoulos, K.A. The role of cytochrome P450 in cholesterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 40:267-273 1973 .
58. Fevold H.R., and Eik-nes Progesterone metabolism by testicular tissue of the English sparrow (*Paser domesticus*) *Gen. Comp. Endocrinol* 3:335-345, 1963.
59. Jones, PBC, Hsueh A.J.W. Pregnenolone biosynthesis by cultured rat granulosa cells: Modulation by follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 111:713-716, 1982.

60. Guengerich, F.P. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 253:7931-1939, 1978.
61. Schimke, R.T. Control of enzyme levels in mammalian tissues. *Adv. Enzymology* 37:135-187, 1973.
62. Lin, T., Chen, G.C.C., Murono, E.P., Osterman J. and Nañkin H.R. The aging Leydig cell: VII Cytoplasmic estradiol receptors. *Steroids* 38:407-415, 1981.
63. Willmer, E.N. Steroids and cells surfaces. *Path Biol.* 9:885-887 April 1961.
64. Kubli-Garfias C. Physiological role of 5β -progesterone metabolites on the CNS. *Trends in Pharmac. Sci.* 5(10):439-442, 1984.
65. Pineda, J.A.: Salinas, M.E., and Warren, J.C: Purification and characterization of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase from bull testis. *J. Steroid Biochem* 23:1001-1006, 1985.
66. Langer, L.T., and Engel, L.L. Human Placental Estradiol- 17β -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 233:583-588, 1958.
67. Wilcox, R.B., and Wiest, W.G. Further studies of rat ovarian 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 7:395-413, 1966.
68. Schoen, E.J. Effect of local irradiation on testicular androgen biosynthesis. *Endocrinology* 75:56-65, 1964.
69. Shikita, M., and Tamaoki, B. 20α -hydroxysteroid dehydrogenase of testes. *Biochemistry* 4:1189-1195, 1965.
70. Sato, F., Inano, H., and Shikita, M. 20α -hydroxysteroid dehydrogenase of porcine testes. *J. Biol Chem.* 247: 815-823. 1972.

71. Tsutsumi, O., Kurachi, H., and Oka, T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 233:975-977. 1986.
72. Holzbauer, M. Physiological variations in the ovarian production of 5α -pregnane derivatives with sedative properties in the rat. *J. Steroid Biochem* 63: 1307-1310. 1975.
73. Noma, K., Sato, B., and Yano, S. Metabolism of testosterone in hypothalamus of male rat. *J. Steroid Biochem* 6: 1261-1266. 1975.
74. Selmanoff, M.K., Brodtkin, L.D., Weiner, R.I., and Siteri, P.K. Aromatization and 5α -reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. *Endocrinology* 101:841-848. 1977.
75. Nuti, K.M., and Karavolas, H.J. Effect of progesterone and its 5α -reduced metabolites on gonadotropin levels in estrogen-primed ovariectomized rats. *Endocrinology* 100: 777-781. 1977.
76. Gay, V.L., and Tomacari, R.L. Follicle-stimulating hormone secretion in the female rat: cyclic release is dependant on circulating androgen. *Science*. 184: 75-76. 1974.
77. Shapiro, M.I., Collu, R., Massé, D., Ducharme, J.R., and Roux, J. F. The influence of varying illumination on steroid 5α -reductase activity and gonadotropin levels in the rat. *Life Sci* 19:1341-1346. 1976.
78. Brown-Grant, K. Steroid hormone administration and gonadotropin secretion in the gonadectomized rat. *J. Endocrinol* 62: 319-332. 1974.

79. Motta, M., Massa, R., Zanisi, M., and Martini, L. Mode of action of androgens and progestogens in neuroendocrine tissues. In: Pharmacological modulation of Steroid Action (eds. Genazzani E., Di Carlo F. and Mainwaring W. J. P.) pp. 187-204 Raven Press, New York. 1980
80. D'Agata, R., Gulizia, S., Ando S., and Polosa, P. Effects of dihydrotestosterone on LH release induced by LH-RH in men. Acta Endocrinol 79: 1-6. 1975.
81. Swerdloff, R.S., Walsh, P.C., and Odell, W.D. Control of LH and FSH secretion in the male: Evidence that aromatization of androgens to estradiol is not required for inhibition of gonadotropin secretion. Steroids 20:13-22. 1972.
82. Zanisi, M., and Martini, L. Effects of progesterone metabolites on gonadotropin secretion. J. Steroid Biochem 6: 1021-1023. 1975.
83. Zanisi, M., and Martini, L. Differential effects of castration on LH and FSH secretion in male and female rats. Acta Endocrinol 78: 683-688. 1975.
84. Martini, L. Neuroendocrine control of the pituitary-ovarian axis. In: Gynecology and Obstetrics, ed. by C. Mc Gregor p.p. 3-25. Excerpta Medica Amsterdam. 1978.
85. Kalra, P.S., Fawcett, C.P., Krulich, L., and Mc Cann, S.M. The effects of gonadal steroids on plasma gonadotropins and prolactin in the rat. Endocrinology 92: 1256-1268. 1973.

86. Wagner, R.K. Extracellular and intra cellular steroid binding proteins. Properties, discrimination, assay and clinical application. Acta Endocrinol 218: 1-73:1978
87. Krieg, M., Bartsch, W., Janssen, W., and Voigt, K.D. A comparative study of binding metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. J. Steroid Biochem. 11:615-624. 1979.
88. Krieg, M., Smith, K., and Voigt, K.D. Receptor affinity and concentration in the cytoplasm of androgen target organs. In: Pharmacological Modulation of Steroid Action. (eds. Genazzani E., Di Carlo F. and Mainwaring W.J.P.) p.p. 123-143. Raven Press. New York, 1980.