

EFFECTES DE LA RIFAMPICINA SOBRE L'ENZIM 3 α -ESTEROIDEHIDROREDUCTASA EN PRÒSTATA DE RATA

Comunicació presentada el dia 1 de febrer de 1978
a les I Jornades d'Endocrinologia de la S.C.B.

per

E. HERNÁNDEZ i J. M. CASTELLANOS

Unitat Catalana de Recerca en Hormonologia
Muntaner, 492. Barcelona-22

RESUM

En aquest treball es descriuen una sèrie d'experiències «in vitro» que demostren que la rifampicina produeix un augment de l'activitat de 3 α -esteroidehidroxidoreductasa en la pròstata de rata. L'augment de l'activitat amb l'ús de testosterona (17- β -hidroxi, 5- α -androst-4-en-3-on) com a substrat, comporta un augment de l'androstandiol (5- α -androstan, 3- α , 17- β -diol) produït, el qual és el responsable de la hiperplàsia i hipersecreció que es produeixen a la glàndula.

INTRODUCCIÓ

La rifampicina, antibiòtic descobert pel grup de LEPETIT, s'usa profusament en terapèutica com a bacteriostàtic d'espectre ampli i molt especialment com a agent antituberculós.

El mecanisme d'acció d'aquest antibiòtic ha estat estudiat per diversos grups d'investigadors^{1, 2, 3} i encara no ha estat completament dilucidat. Algunes experiències han demostrat que la rifampicina inhibeix la síntesi de l'àcid ribonucleic (RNA) i per tant inhibeix la síntesi de proteïnes. Aquest fenomen només es produeix en el citoplasma bacterià i sembla ésser que l'enzim RNA-polimerasa no és compromès en el cas dels mamífers.

Una altra sèrie d'experiències permeten també donar suport a aquest tipus d'acció. La rifampicina inhibeix la replicació d'alguns virus, tant «in vitro» com «in vivo». Aquest fenomen només es produeix sobre aquells virus que contenen àcid desoxiribonucleic (DNA) i, en canvi, l'acció inhibidora no es produeix sobre aquells que contenen RNA^{4, 5, 6}.

D'una altra banda, el mecanisme d'acció de les hormones esteroides a nivell celular es produeix mitjançant la interacció que s'estableix primer amb certes proteïnes citoplasmàtiques —receptors citosòlics— i després amb el material nuclear^{7, 8}.

L'esteroide és capaç de formar un complex amb el DNA i, com a conseqüència d'aquest efecte, dirigir la síntesi de noves proteïnes en els ribosomes a través de RNA m^{9, 10, 11}.

Com que ambdós fenòmens tenen un eix comú, el DNA, volguérem estudiar la interacció que podria existir entre el citat antibiòtic i un esteroide com la testosterona. A fi de preparar el model experimental, decidírem utilitzar la pròstata de la rata, òrgan dependent de la testosterona i que és capaç de transformar aquesta hormona en el seu derivat reduït, l'androstanolona i dihidrotestosterona (DHT) i altres metabòlits hidroxilats, principalment el 3- α -androstadiol¹².

PART EXPERIMENTAL

a) *Experiències «in vivo»*. S'usaren rates mascles Wistar d'un pes que oscil·lava al voltant dels 300 grams. Aquests animals s'alimentaren amb un pinso «Panlab» i begueren aigua *ad libitum*. Es formaren dos grups: l'un integrat per 17 animals als quals fou administrada 4 mg diaris de rifampicina durant 15 dies mitjançant intubació esofàgica, i l'altre integrat per 10 animals que fou usat com a control.

Dues hores abans d'administrar-los la rifampicina els fou suprimit el pinso i l'aigua amb la finalitat d'afavorir l'absorció intestinal.

Acabat el tractament, entre 18 i 24 hores abans de ser sacrificats, els animals foren castrats mitjançant abordatge escrotal (vegeu fig. 1) a fi d'eliminar la màxima testosterona circulant.

Abans de procedir a la castració foren pesats. Se'ls mantigué anests amb èter, el qual fou ben tolerat pels animals.

Es procedí a l'eliminació dels testicles i en fou anotat el pes. Un cop acabada la intervenció, les rates es recuperaren fàcilment i foren alimentades amb pinso i aigua entre 18 i 24 hores.

Passat aquest temps, foren sacrificades. Un cop localitzada la pròstata, fou extreta, així com la veixiga i part muscular (fig. 2). Ja a l'exterior, foren eliminades les parts que no hi tenien res a veure i amb un bisturí fou apartat el greix i el teixit conjuntiu que hi havia adherit (figura 3). Immediatament foren pesades i congelades fins al moment d'efectuar l'experiència.

El procés d'homogeneïtzació i incubació es realitzà entre 1 i 10 dies després de la prostatectomia. Les pròstates foren homogeneïtzades en

un homogeneïtzador «Potter» amb 4 ml de solució de fosfats Krebs-Ringer a pH=7,5 mantingut a 4° C en un bany d'aigua i gel. L'homogeneïtzat fou passat a un tub cònic. Aquest tub contenia 10 μ mol de NADHP (sal tetrasòdica) i 20.000 d.p.m. de testosterona tritiada (activitat específica: 100 ci/ μ mol). A continuació fou incubat en un bany d'aigua a 37 °C durant 60 minuts i mantenint de forma continuada un corrent de CO₂/O₂ (95/5) a través d'una solució.

Passats els 60 minuts, la reacció fou aturada mitjançant l'addició d'unes gotes d'àcid acètic glacial. Abans d'afegir l'àcid foren separades dues alíquotes de 20 μ l cadascuna en sengles tubs per a determinar per duplicat les proteïnes totals pel mètode de LOWRY.

A continuació, la barreja fou extreta amb èter etílic tres cops amb 3 ml cada cop. Aquests tres extractes es reuniren en un tub cònic filtrant-los sobre una gasa que contenia Na₂SO₄ anhidre. Els extractes eteris reunits foren duts a sequedat mitjançant un corrent de N₂ en una planxa calefactora mantinguda a 40-50 °C. Els extractes secs foren dividits en dues parts i una d'aquestes parts fou acetilada (se li afegiren 100 μ l de piridina i 100 μ l d'anhídrid acètic) i fou mantingut durant divuit hores a temperatura ambient. Al mateix temps foren acetilats també 20 μ g de cada esteroide (T, DHT, A diol) per a usar-los com a estàndards en la cromatografia.

Un cop eliminat l'excés de piridina i anhídrid acètic amb benzè i en corrent de N₂, foren dissolts en petites quantitats de clorur de metilè i aplicades en plaques de silicagel. Foren cromatografiats en el sistema benzè/acetat d'etil (90/10) V/V. Les plaques foren revelades amb fosfomolibdic en solució etanòlica, aplicant a la part corresponent als estàndards un corrent d'aire calent mitjançant un assecador.

Un cop localitzats els estàndards, les zones corresponents a la T (Rf: 0,58), DHT (Rf: 0,76) i A diol (Rf: 0,92) (fig. 4), foren rascades de la placa i eluïdes amb etanol. La solució etanòlica fou duta a sequedat en vials de centelleig. A continuació s'hi afegiren 10 ml de líquid de centelleig (PPO, 3 g; tritó×100, 500 ml i 1.000 ml de toulè) que foren comptats en un espectòmetre d'escintil·lació líquida Intertechnique S. L.-30 i l'eficiència es calculà mitjançant un estàndard extern.

b) *Experiències «in vitro»*. Hom agafà cinc rates (no tractades amb rifampicina) i les castrà 18 hores abans que els fos extreta la pròstata (la tècnica utilitzada fou la mateixa que en el cas anterior). Per a homogeneïtzar aquestes pròstates s'utilitzaren 25 ml de solució Krebs-Ringer.

Hom prengué 6 alíquotes de 4 ml cada una d'aquest homogeneïtzat. Dues alíquotes foren preses com a blancs i a les altres quatre els fou agregat 30 μ g de rifampicina i foren mantinguts en contacte amb l'antibiòtic durant 5^m (1 tub), 20^m (dos tubs) i 60^m (1 tub), a 37 °C. Un cop passà

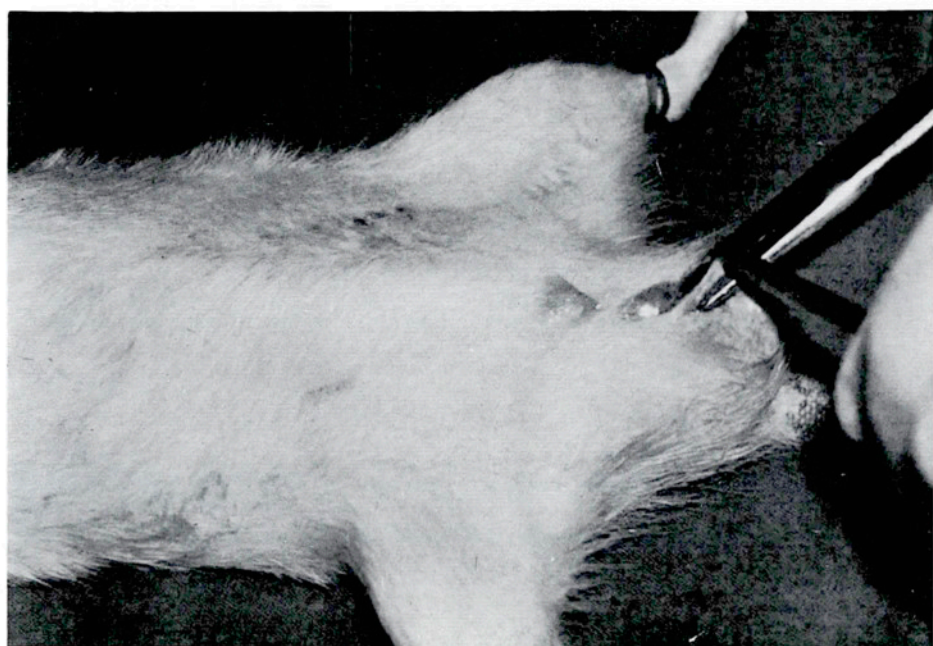


FIG. 1.

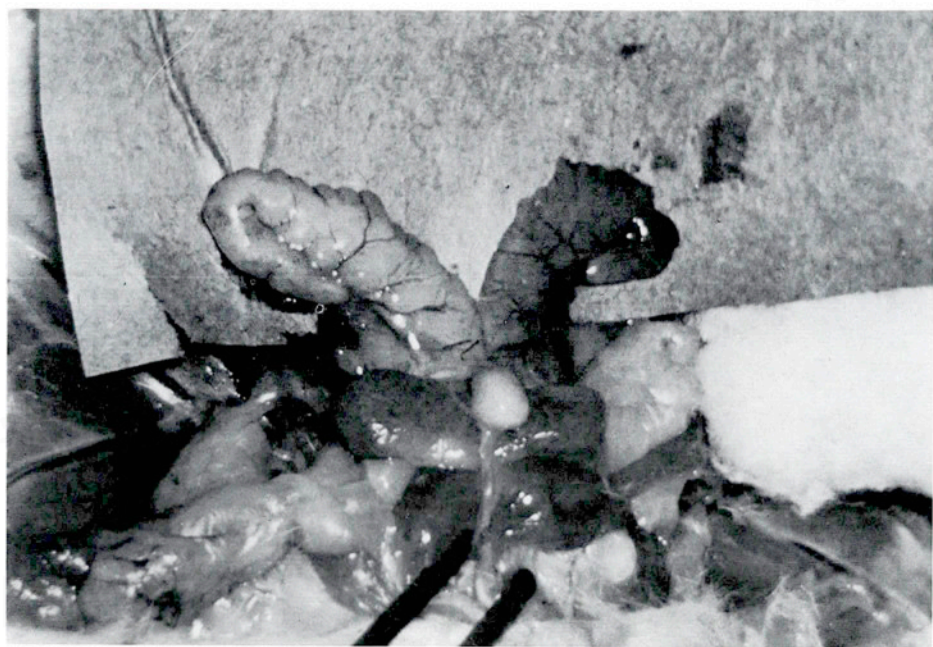


FIG. 2.

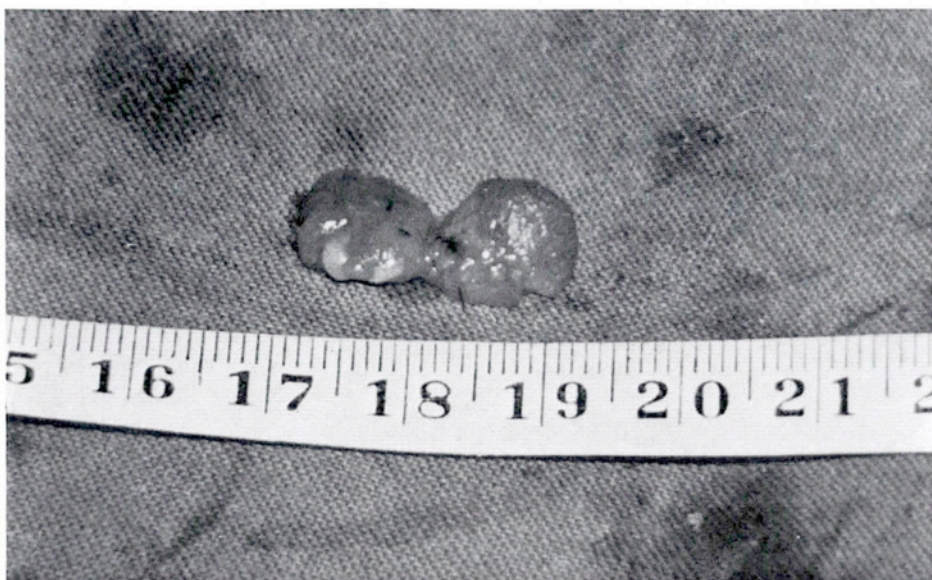


FIG. 3.

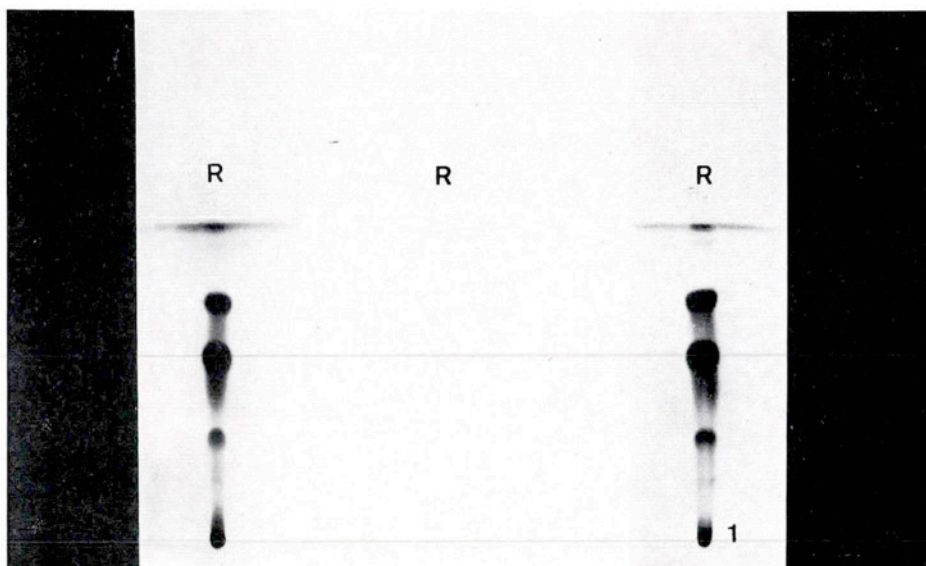


FIG. 4.—Cromatografia en capa fina per a la purificació dels extractes: R, patrons de referència [1, aplicació; 2, testosterona (Acetat); 3, DHT (Acetat); 4, Adrostandiol (Diacetat)]. Revelat amb fosfomolibdic.

P: posició a on es troba la mostra d'extracte. Aquesta zona no és revelada i són diluïts els esteroides corresponents amb etanol absolut.

aquest temps distint per a cada una de les sèries, es transvassà ràpidament a altres tubs que contenien testosterona tritiada i NADPH. D'aquesta manera s'incubaren una hora a 37 °C. Els tubs que havien estat agafats com a blancs foren incubats també una hora. La rifampicina s'hi posà en el mateix moment de començar la incubació.

Passat el temps d'incubació, hom procedí tal com hem explicat en l'apartat anterior. La reacció fou aturada amb acètic, extracció amb èter, cromatografia en capa fina i comptatge de la radioactivitat.

RESULTATS

a) *Experiències «in vivo»*

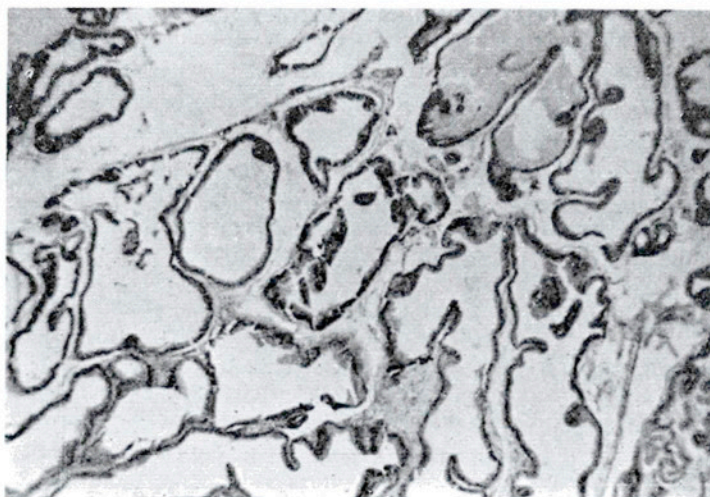
Els resultats d'aquestes experiències ja foren descrites per nosaltres anteriorment¹³.

1. Pes de les pròstates: No s'ha trobat cap diferència entre el pes dels animals i el pes dels testicles de les rates entre ambdós grups. En canvi, hom ha trobat una diferència significativa important ($p < 0,001$) en el pes de les pròstates entre el grup control ($322,1 \pm 42,2$ mg) i el grup d'animals que prengué rifampicina ($420,8 \pm 87,7$ mg).

2. Histologia: En la figura 5 s'observa que les pròstates d'aquells animals tractats amb rifampicina contenen un nombre més gran d'acinis i una hiperplàsia glandular acompanyada d'una hipersecreció de proteïna respecte a la pròstata normal (fig. 6).



FIG. 5. — Tall histològic d'una pròstata de rata tractada amb Rifampicina (H. E. $\times 100$). Tingueu present els focus d'hiperplàsia i hipersecreció.

FIG. 6. — Tall histològic d'una pròstata del Grup Control (H. E. $\times 100$).

TAULA 1

GRUP CONTROL (n=10)			
	R	DIOL	DHT
m	4.413,7 *	1.210,2 * (26,6 %)	1.035,6 * (24,2 %)
s.d.	$\pm 923,2 *$	$\pm 851,5 (16,1 \%)$	$\pm 232,5 * (6,5 \%)$
GRUP TRACTAT (n=17)			
	R	DIOL	DHT
m	4.576,5 *	3.035,8 * (63,4 %)	892,8 * (18,8 %)
s.d.	$\pm 1.159,9 *$	$\pm 878,6 * (10,5 \%)$	$\pm 392,0 * (5,7 \%)$

R: radioactivitat recuperada; DIOL: Androstandiol; DHT: Dihidrotestosterona; n=número de animals; m=mitjana; s.d.=desviació Standard; *d.p.m. (descomposicions per minut).

3. Metabolisme de la testosterona: La taula 1 mostra el percentatge de la radioactivitat recuperada que és transformada en dihidrotestosterona i androstandiol. Les rates sotmeses al tractament amb l'antibiòtic mostraren una transformació més acusada de la testosterona en androstandiol ($63,4 \pm 10,5 \%$) que aquelles que constitueixen el grup control ($26,6 \pm 16,1 \%$) $p < 0,001$.

TAULA 2

Incubació Temps (minuts)	R	T	DIOL	DHT
0	8.750 * ± 1.268	5.135 * (58,1 %) ± 792 * (14 %)	2.119 * (23,8 %) ± 543 * (2,5 %)	1.549 * (17,8 %) ± 3,6 * (2,6 %)
5	16.425 *	2.733 * (16,6 %)	10.524 * (64,0 %)	3.167 * (19,2 %)
20	14.266 * ± 2.138 *	2.993 * (21,4 %) ± 327 * (5,4 %)	7.387 * (51 %) ± 2.971 * (13,1 %)	3.846 * (27,3 %) ± 506 * (7,7 %)
60	18.286 *	4.118 * (22,5 %)	10.475 * (57,3 %)	3.691 * (20,2 %)

R: Radiactivitat Recuperada (c.p.m.); T: Testosterona; DIOL: Androstandiol; DHT: Dihidrotestosterona; *c.p.m.: (comptatges per minut).

b) Experiències «in vitro»

La taula n.º 2 mostra les quantitats de dihidrotestosterona i androstandiol formades sense incubació de les pròstates amb rifampicina i prèvia incubació de les pròstates tractades amb rifampicina a temps distints. Les pròstates tractades amb rifampicina un temps mínim de cinc minuts mostren una transformació més gran de la testosterona en androstandiol ($57,3 \pm 6,50$ %) que les que no foren incubades amb l'esmentat antibiòtic ($23,8 \pm 2,5$ %), $p < 1 \times 10^{-5}$.

COMENTARIS

Volem concloure aquesta exposició dient que les rates foren castrades 18 hores abans de sacrificar-les amb la finalitat de disminuir la quantitat de testosterona circulant i d'aquesta manera aconseguir que els receptors de la pròstata quedessin lliures en el moment de la incubació.

Publicacions d'altres grups abonen els nostres resultats. BOLT *et al.*¹⁴ observaren que el fetge de persones que prenen rifampicina era capaç d'hidroxilar els estrògens molt més eficaçment que el fetge de persones no sotmeses al tractament amb aquest antibiòtic. STANLEY *et al.*¹⁵ explicaren sobre aquesta base els trastorns menstruals que patien certes pacients sotmeses a aquest tractament. Fins i tot s'ha descrit una incidència més gran d'embarassos en dones que prenen contraceptius orals i rifampicina alhora (B. PIQUET *et al.*)¹⁶. L'augment de la

capacitat hidroxilant del fetge per efecte de la rifampicina fa que augmenti l'eliminació d'estrògens i la seva dosi circulant sigui insuficient per inhibir la secreció de la LH hipofisària.

Les experiències que hem descrit en aquest treball demostren que la rifampicina augmenta l'activitat d'un enzim, la 3- α -esteroidehidroxilasa (estem confirmant en el nostre laboratori, si realment es tracta de la 3- α o 3- β), per un mecanisme que encara desconeixem. L'augment de l'androstandiol format és el responsable de la hiperplàsia i hipersecreció glandular. Aquests efectes els descriu BAULIEU el 1970¹².

És probable que l'efecte de l'antibiòtic sobre el complex nuclear faci que augmenti la síntesi d'aquesta proteïna enzimàtica. També hi hauria la possibilitat que, a través d'un efecte central, aquest antibiòtic augmentés la síntesi de testosterona i que aquesta hormona fos la responsable de la iniciació de la síntesi de l'enzim (*feedback inhibition*). Aquesta darrera suposició, no obstant, està en contraposició amb els resultats que hem trobat tant «in vivo» com «in vitro», ja que en aquestes experiències l'efecte s'ha produït en l'òrgan aïllat i «in situ».

Una experiència que vam fer amb animals senils i afectats d'hiperplàsia prostàtica (pròstata d'un pes al voltant d'1 g) ens ha proporcionat una certa llum per a una explicació d'aquest fenomen. (Vegeu taula 3.)

	minuts			
	0	5	20	60
T	22,5 % (\pm 1,1)	28,8 % (0,8)	35,5 % (2,8)	37,2 % (0,21)
DHT	17,2 % (\pm 2,3)	15,8 % (0,6)	25,8 % (1,9)	23,6 % (2,3)
A diol	60,1 % (\pm 4,0)	55,4 % (0,15)	38,3 % (0,84)	39,0 % (2,5)

Metabolisme en pròstates hiperplàsiques

Percentatges sobre la radiactivitat recuperada per cada un dels esteroides (T testosterona; DHT dihidrotestosterona; A diol Androstandiol) quan varen ésser incubats els citols a diferents temps amb rifampicina.