

Tesis de Licenciatura

Estudios de los procesos de foso/desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina y de tirosina en la regulación de la esteroidogénesis estimulada por las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH) y gonadotrofina coriónica (hCG)

Poderoso, Cecilia

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Poderoso, Cecilia. (). Estudios de los procesos de foso/desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina y de tirosina en la regulación de la esteroidogénesis estimulada por las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH) y gonadotrofina coriónica (hCG). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000718 Poderoso, Cecilia. "Estudios de los procesos de foso/desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina y de tirosina en la regulación de la esteroidogénesis estimulada por las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH) y gonadotrofina coriónica (hCG)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000718_Poderoso

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DE LICENCIATURA

Estudios de los procesos de fosfo/desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina y de tirosina en la regulación de la esteroidogénesis estimulada por las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH) y gonadotrofina coriónica (hCG).

Alumna: Cecilia Poderoso

Director: Dr. Ernesto Jorge Podestá

Co-Directora: Dra. Cristina Del Valle Paz

Lugar de trabajo: Laboratorio HRDC (Hormonas en la Reproducción y Diferenciación Celular). Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

2000

71873

RESUMEN

Las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH) y luteneizante (LH) regulan la esteroidogénesis mediante un mecanismo que involucra la activación de la PKA y la fosfo/desfosforilación de proteínas que regulan el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna, paso limitante de la vía. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación y el mecanismo de acción de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) y de proteína serina/treonina fosfatasas (PPs) en la regulación de la esteroidogénesis mediada por ACTH y por LH, en zona fasciculata (ZF) de corteza adrenal y en células de Leydig de testículo de rata respectivamente.

Utilizando potentes inhibidores permeables de PTPs comprobamos que en los dos sistemas estudiados la estimulación hormonal de la esteroidogénesis depende obligatoriamente de la actividad de PTPs y que el sitio de acción de las mismas se sitúa entre la activación de la PKA y el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna. Además comprobamos que ACTH produce una disminución en el contenido de fosfotirosina de proteínas endógenas, incluyendo una proteína del citoesqueleto (paxilina). Estos resultados, sumados a que en nuestro laboratorio también se demostró que ACTH produce un incremento rápido y transiente de la actividad de PTPs, sugieren que la desfosforilación en tirosina juega un rol crítico en la regulación hormonal de la esteroidogénesis.

Al estudiar el efecto de dos inhibidores permeables de PPs sobre la esteroidogénesis estimulada por ACTH y por LH/CG observamos que, aún cuando ambos compuestos fueron equipotentes para inhibir *in vivo* la actividad de estas enzimas, sólo uno de ellos inhibió significativamente la esteroidogénesis estimulada por hormona, indicando que no existe grado de correlación de las PPs y la inhibición de la esteroidogénesis.

Con estos resultados demostramos que la respuesta esteroidogénica máxima requiere de la actividad de PTPs y de la desfosforilación de sustrato(s) en residuos de tirosina y que esta desfosforilación puede ser mediada por activación de quinasas de serina/treonina.



Dr. ERNESTO J. PODESTA
PROF. REG. TIT. DTO. BIOL.
FAC. DE MEDICINA (UBA)



Dra. CRISTINA DEL V. P.
PROFESORA ADJUNTA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA (U. B. A.)

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que figuran en esta lista y a muchas otras ¡Gracias!.

-Al Dr. Ernesto Jorge Podestá, quien me dio la posibilidad de trabajar en el Laboratorio HRDC y me orientó y ayudó en mis inicios en el campo de la investigación.

-A la Dra. Cristina Del Valle Paz, quien me ayudó permanentemente a lo largo de los años de trabajo en el Laboratorio y me enseñó con paciencia y dedicación, el manejo de las técnicas empleadas.

-A Fabiana Cornejo Maciel, por su colaboración y buenos consejos durante el desarrollo del trabajo.

-A Alejandra Gorostizaga, quien me ayudó con mucho cariño en la realización de los experimentos.

-A Paula Maloberti, por la buena onda que siempre aporta al Laboratorio.

-A mis compañeros del Laboratorio y de la Cátedra, Isabel Neuman, Ceci Colonna, Sebastian Lotito, Pablo Mele, Carlos Mendez, Cora Cymering, Paula Bey, Florencia Cano, Ceci Vazquez con quienes comparto muchas horas al día, por su amistad y colaboración en todo lo que necesito.

-A mis amigas de toda la vida, Marina, Gloria, Aku, Florencia, Paula, Alejandra porque compartimos momentos muy importantes y por su ayuda permanente cuando la necesité y muy especialmente a Marina y a Gloria por su colaboración con las figuras de este trabajo.

-A mis amigos de la facultad, Gaby Palacios, Lau Ratier, Javi De Gaudenzi, Nacho Tunez, Guille Lobo, Sebas Laría, Sebas Lotito con quienes compartí momentos inolvidables durante largas horas de estudio y no tanto.

-A mis abuelas Clelia y Billy, mis abuelos Tito y Eduardo, mi tía Porota, por haberme ayudado y cuidado permanentemente.

-A mis papás, Teddy y Coque, por su amor y gracias a los cuales aprendí las cosas más importantes de la vida, que hicieron posible el cumplimiento de muchos sueños.

-A Fede, por su comprensión y ayuda permanente y por compartir mi amor desde hace cinco años.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pag.
I- LA ZONA FASCICULATA DE CORTEZA ADRENAL Y LAS CÉLULAS DE LEYDIG COMO SISTEMAS PRODUCTORES DE ESTEROIDES.....	1
I-1 Generalidades.....	1
I-2 Anatomía e histología de la glándula adrenal y del testículo.....	2
I-3 Biosíntesis de hormonas esteroideas. Reacciones y enzimas involucradas.....	5
I-4 Control endócrino de la esteroidogénesis.....	7
I-5 Mecanismo de acción de ACTH y LH/CG.....	9
I-6 El rol del citoesqueleto en la esteroidogénesis.....	14
II- FOSFATASAS DE PROTEÍNAS.....	17
II-1 Proteínas fosfatasas. Generalidades y clasificación.....	17
II-2 Proteínas tirosina fosfatasas.....	18
II-2.1 Estructura y función del dominio catalítico de las PTPs.....	19
II-2.2 Regulación de la actividad de PTPs.....	19
II-3 Proteínas serina/treonina fosfatasas.....	23
III- PARTICIPACIÓN DE LAS FOSFATASAS EN LA ESTEROIDOGENÉISIS.....	26

III-1 La desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina como posible evento integrante del mecanismo de acción de ACTH.....	26
III-2 Estudios sobre el efecto de la inhibición de PPs sobre la producción de esteroides estimulada por ACTH.....	27
III-3 Efecto de los inhibidores de PPs en el mecanismo de acción de FSH y LH.....	29

OBJETIVOS.....	32
-----------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

I MATERIALES.....	33
I-1 Reactivos utilizados.....	33
I-2 Animales.....	34
II MÉTODOS.....	34
II-1 Estimulación <i>in vivo</i> de glándulas adrenales.....	34
II-2 Fraccionamiento subcelular.....	34
II-3 Valoración de la actividad de tirosina fosfatasas.....	35
II-4 Valoración de la actividad de serina/treonina fosfatasas.....	35
II-4.1 Marcación del sustrato.....	35
II-4.2 Obtención de las muestras a valorar.....	36
II-4.3 Determinación de la actividad.....	36
II-5 Western-blot.....	37
II-6 Preparación de células de ZF de adrenal e intersticiales de testículo.....	37
II-7 Incubación de células de ZF de adrenal e intersticiales de testículo.....	38
II-8 Análisis de inmunoprecipitación.....	39

II-9 Determinación de proteínas.....	40
II-10 Análisis estadístico.....	40

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PTPs SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS.....	41
I-1 Inhibición de PTPs en células de ZF de corteza adrenal.....	41
I-2 Inhibición de PTPs en células intersticiales de testículo.....	48
II- ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA DE ZF DE ADRENAL DE RATA.....	53
II-1 Análisis por Western-blot.....	53
II-2 Identificación de un sustrato endógeno de PTPs desfosforilado por acción deACTH.....	56
III- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PPs SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS.....	58
III-1 Inhibición de PPs en células de ZF de corteza adrenal.....	58
III-2 Inhibición de PPs en células intersticiales de testículo.....	62

CONCLUSIÓN.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	69

ABREVIATURAS

AA: Acido araquidónico.

AC. Adenilil ciclasa.

ACTH: Hormona adrenocorticotrófica, adrenocorticotrofina.

AMPc: 3', 5' adenosina monofosfato cíclico.

8-Br AMPc: 8-Bromo AMPc.

ATP: Adenosina trifosfato.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CA: Caliculina A.

Citocromo P-450_{scc}: Complejo enzimático citocromo P-450 que corta la cadena lateral del colesterol.

DHEA: Dehidroepiandrosterona.

DSPs: Proteínas fosfatasas de especificidad dual.

FSH: Hormona folículo estimulante.

hCG: Gonadotrofina coriónica humana.

I 1: Inhibidor 1.

I 2: Inhibidor 2.

Ig: Inmunoglobulina.

LH: Hormona luteinizante.

LMPs: Proteínas fosfatasas de bajo peso molecular.

LPH: Hormona lipotrofina.

MIX: 3-isobutil 1-metilxantina.

MSH: Hormona melanocito estimulante.

No-TM PTPs: proteínas tirosina fosfatasas no transmembrana.

OK: Acido okadaico.

PAO: Oxido de fenilarsina.

P4: Progesterona.

P5: Pregnenolona.

PDE: Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

PEST: Secuencia aminoacídica Pro-Glu-Ser-Tre.

PKA: Proteína quinasa AMPc dependiente.

PKC: Proteína quinasa Ca^{++} dependiente.

pNPP: Paranitrofenilfosfato.

POMC: Proopiomelanocortina.

PPs: Proteínas serina/treonina fosfatasas.

PTP: Proteína tirosina fosfatasas.

PV: Pervanadato.

22R-OHcolesterol: 22R-hidroxicolesterol.

RIA: Radioinmunoanálisis.

R PTPs: proteína tirosina fosfatasas tipo receptor.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

TBS: Solución salina con Tris 20 mM.

7 TMS: Siete segmentos transmembrana.

TTBS: Solución TBS con 0,5% de Tween 20.

ZF: Zona fasciculata de corteza adrenal.

ZG: Zona glomerulosa de corteza adrenal.

ZR: Zona reticularis de corteza adrenal.

INTRODUCCIÓN

I- LA ZONA FASCICULATA DE CORTEZA ADRENAL Y LAS CÉLULAS DE LEYDIG COMO SISTEMAS PRODUCTORES DE ESTEROIDES

I-1 Generalidades

Funciones tan diversas como la diferenciación sexual, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, la regulación del metabolismo de glúcidos y el mantenimiento del equilibrio hídrico entre otras, son controladas por hormonas esteroideas. El término químico esteroide se refiere a una variedad de componentes lipídicos, todos los cuales poseen la estructura básica de cuatro anillos de carbono conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno o núcleo esteroide. Los principales tejidos esteroideogénicos son la corteza adrenal, el testículo, el ovario y la placenta.

Las células foliculares del ovario producen estrógenos. El estrógeno de origen ovárico más importante es el 17β estradiol.

Los progestágenos, como la progesterona y la pregnenolona, son intermediarios en la síntesis de todos los esteroides gonadales y suprarrenales; la progesterona es una hormona clave en el ciclo reproductivo, se produce y secreta a la sangre por el cuerpo lúteo inicialmente y por la placenta, luego de los 25 días de la implantación del embrión en el endometrio. La placenta secreta los esteroides necesarios para el mantenimiento de la preñez, como la hormona lactógeno placentaria y la gonadotrofina coriónica (CG).

La glándula adrenal produce principalmente dos grupos de hormonas esteroideas, los glucocorticoides y los mineralocorticoides. El cortisol es el glucocorticoide predominante en humanos, en tanto que la corticosterona, menos abundante en el hombre, es el glucocorticoides más importante en los roedores. La aldosterona es el mineralocorticoide más potente.

Los andrógenos, entre los que se encuentra la testosterona, son producidos principalmente en el testículo por las células de Leydig.

I-2 Anatomía e histología de la glándula adrenal y del testículo

Nos interesa describir a nivel anatómico e histológico la glándula adrenal y el testículo principalmente, ya que los trabajos presentados aquí se realizaron en células obtenidas de los tejidos mencionados: células adrenocorticales y de Leydig respectivamente.

Las glándulas suprarrenales o adrenales de los mamíferos son estructuras pares que se localizan en el polo superior de los riñones. Si se secciona la glándula adrenal en un plano longitudinal, se distinguen una cápsula de tejido conectivo que rodea toda la glándula y dos regiones bien diferenciadas, conformando prácticamente dos glándulas endocrinas separadas, tanto a nivel histológico como por las hormonas que cada una produce. La porción externa o **corteza adrenal**, está compuesta mayormente por células adrenocorticales esteroideogénicas, con alto contenido de gotas lipídicas. La corteza adrenal es de origen mesodérmico, deriva del epitelio celómico en la región pronéfrica del embrión, adyacente a la cresta genital. La porción interna, rodeada por la corteza, se denomina **médula** y está conformada por células cromafines. Estas células son de origen ectodérmico, derivan de la cresta neural y funcionan esencialmente como ganglios simpáticos modificados, ya que están bajo control directo de neuronas preganglionares simpáticas colinérgicas y liberan a la circulación noradrenalina y principalmente adrenalina.

La corteza adrenal en mamíferos se subdivide, según criterio histológico, principalmente en tres regiones bien diferenciadas: la zona glomerulosa (ZG), la zona fasciculata (ZF) y la zona reticularis (ZR) (Arnold, 1866).

La ZG es la más externa y delgada de las tres, las células que la componen son pequeñas, redondeadas y contienen menos lípidos que las de la ZF. En la ZG

se producen los mineralocorticoides, como la aldosterona y otros, que regulan el balance hídrico por sus efectos sobre la concentración de Na^+ y K^+ .

La ZF se localiza entre la ZG y la ZR y es histológicamente distinta de ambas. Consiste en células poliédricas, con gran contenido de gotas lipídicas, distribuidas en largas columnas paralelas que se extienden radialmente desde la ZG hacia la ZR, rodeadas de sinusoides que permiten el contacto directo y extendido de las células con la circulación. La ZF produce los glucocorticoides que juegan un rol fundamental en el metabolismo de los glúcidos, en la respuesta a situaciones de stress y en la regulación de la respuesta inflamatoria.

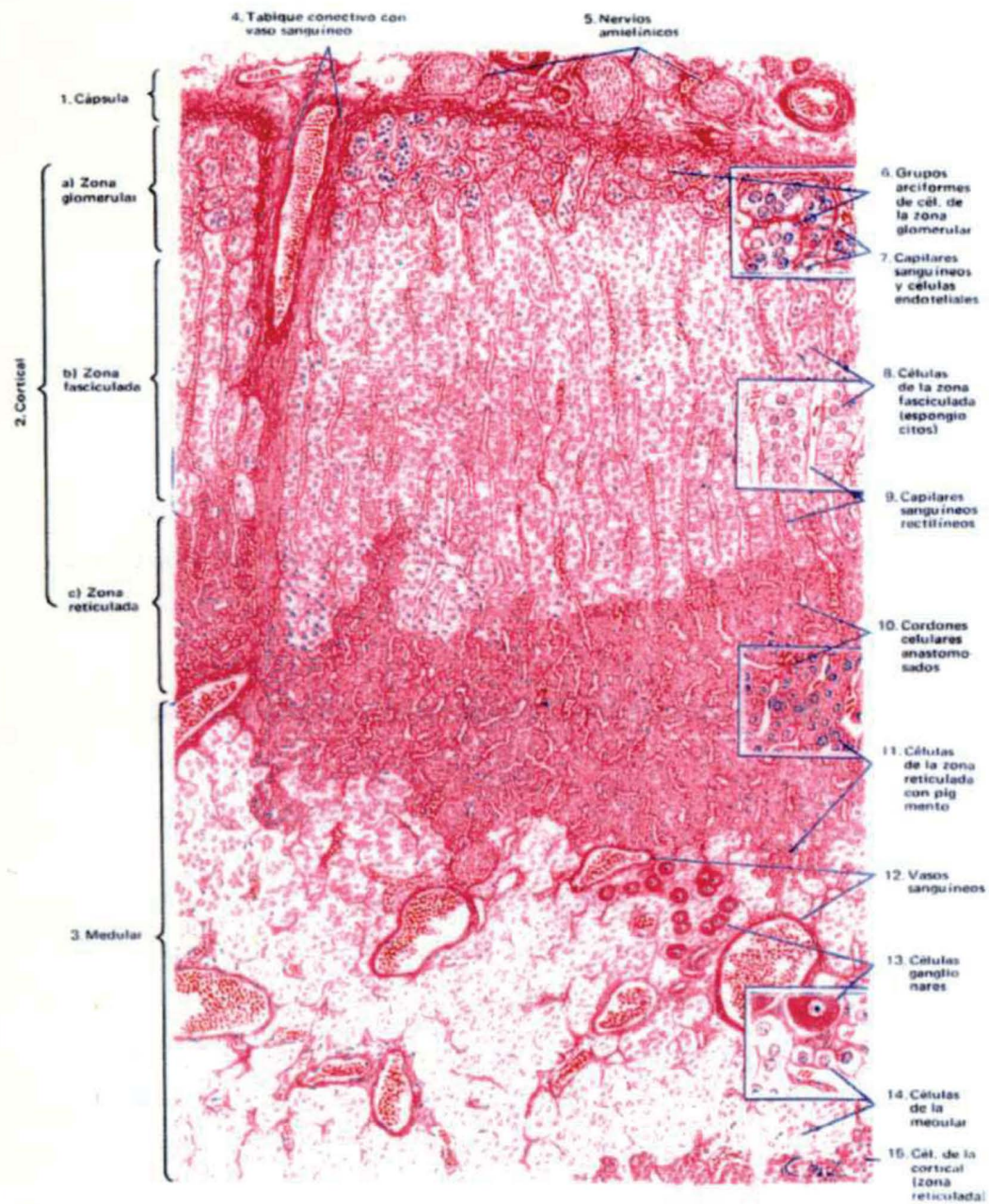
La ZR bordea la médula adrenal y contiene numerosas fibras reticulares. Sus células se disponen de forma irregular, poseen gotas lipídicas y están considerablemente pigmentadas. Esta región es la fuente principal de andrógenos adrenales, como la dihidroepiandrosterona (DHEA), pero también se sintetizan algunos glucocorticoides.

En la Figura 1 se observa un corte histológico longitudinal de la glándula adrenal.

Los andrógenos, entre los que se encuentra la testosterona, son producidos principalmente en el testículo por las células de Leydig.

Los primordios gonadales de los mamíferos surgen del mesodermo intermedio como una cresta genital, fuertemente asociados a los riñones mesonéfricos. Los primordios gonadales consisten en una **corteza** externa, derivada del peritoneo, y una **médula**. Inicialmente, los componentes medulares se diferencian en cuerdas sexuales primarias. La diferenciación de dichas cuerdas y la regresión de la corteza, resulta en el testículo. Cada testículo está formado por los túbulos seminíferos en los que se distinguen distintos tipos celulares, como las células germinales y las células de Sertoli, estas últimas indispensables para el desarrollo de las gametas. Las células intersticiales se localizan entre los túbulos y se dividen en células de sostén y células esteroideogénicas, que son las células de Leydig. La aparición de caracteres sexuales secundarios así como también el mantenimiento de la espermatogénesis, constituyen eventos completamente dependientes de los andrógenos producidos por las células de Leydig.

FIGURA 1: Corte histológico de la glándula adrenal



Corte transversal de la glándula adrenal. Coloración hematoxilina-eosina 200x

Fuente: Nuevo Atlas de Histología. M. Fiore, R. Mancini y E. de Robertis.

En la Figura 2 se observa un corte histológico de testículo.

I-3 Biosíntesis de hormonas esteroideas. Reacciones y enzimas involucradas

Las hormonas esteroideas se sintetizan a partir del colesterol, un esteroide de 27 átomos de carbono. El colesterol sintetizado en el hígado y el obtenido por la ingesta es liberado a circulación formando parte de las lipoproteínas, a través de las cuales es captado por las células esteroidogénicas para la síntesis de esteroides. Estas células también pueden sintetizar su propio colesterol como sustrato para la esteroidogénesis, pero lo hacen en menor proporción.

La primera etapa de la biosíntesis de hormonas esteroideas consiste en la conversión de colesterol a pregnenolona (P5), un esteroide de 21 C e isocaproaldehído (Solomon y col., 1956; Dorfman y col., 1957). Esta reacción, que comprende dos hidroxilaciones sucesivas (en C₂₂ y C₂₀) y la escisión de la cadena lateral del colesterol, es catalizada por un complejo enzimático localizado en la membrana mitocondrial interna. Este complejo, denominado P-450_{SCC} (side chain cleavage), está compuesto por tres proteínas: una flavoproteína, una proteína denominada adrenodoxina y el citocromo P-450. La conversión de P5 a progesterona (P4) involucra la oxidación del grupo hidroxilo del C₃ a función cetona y la isomerización del doble enlace (Δ^5 a Δ^4). Estas transformaciones pueden ocurrir antes o después de la hidroxilación en el C₁₇. Estas dos posibilidades se conocen como vías Δ^4 y Δ^5 . Dos enzimas catalizan la transformación de P5 ó 17 α -OH P5 a P4 ó 17 α -OH P4 respectivamente: una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y una isomerasa (Ewald, 1964; Kruskemper, 1964). Si la 3 β -HSD actúa tempranamente en la secuencia convirtiendo P5 a P4, las subsecuentes transformaciones enzimáticas de la progesterona se conocen como el camino Δ^4 . Cuando P5 no se convierte inicialmente a P4, es transformada enzimáticamente a través del camino Δ^5 .

FIGURA 2: Corte histológico del testículo



Corte transversal del testículo. Coloración hematoxilina-eosina 200x

Fuente: Nuevo Atlas de Histología. M. Fiore, R. Mancini y E. de Robertis.

La enzima 21-hidroxilasa cataliza la hidroxilación en C₂₁ de los esteroides P4 y 17 α -OH P4, lo cual conduce a la formación de 11-desoxicorticosterona y 11-desoxicortisol respectivamente. A partir de estos esteroides se generan corticosterona y cortisol en una reacción catalizada por una enzima de la membrana mitocondrial interna, 11 β -hidroxilasa. La síntesis de aldosterona a partir de corticosterona ocurre mediante dos reacciones, la primera de ellas lleva a la formación de 18-hidroximetilcorticosterona y seguidamente este intermediario es oxidado a la forma aldehído (Pascualini, 1964; Nicolis y Ulick, 1965). La enzima que cataliza esta última reacción existe casi exclusivamente en ZG, por lo tanto la producción de aldosterona se limita a esa zona. En humanos, la aldosterona es el producto con actividad mineralocorticoide más potente y secretado en mayor proporción.

Otros esteroides son sintetizados en la corteza adrenal. Entre ellos los andrógenos dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, testosterona y estrógenos, en orden de importancia cualitativa.

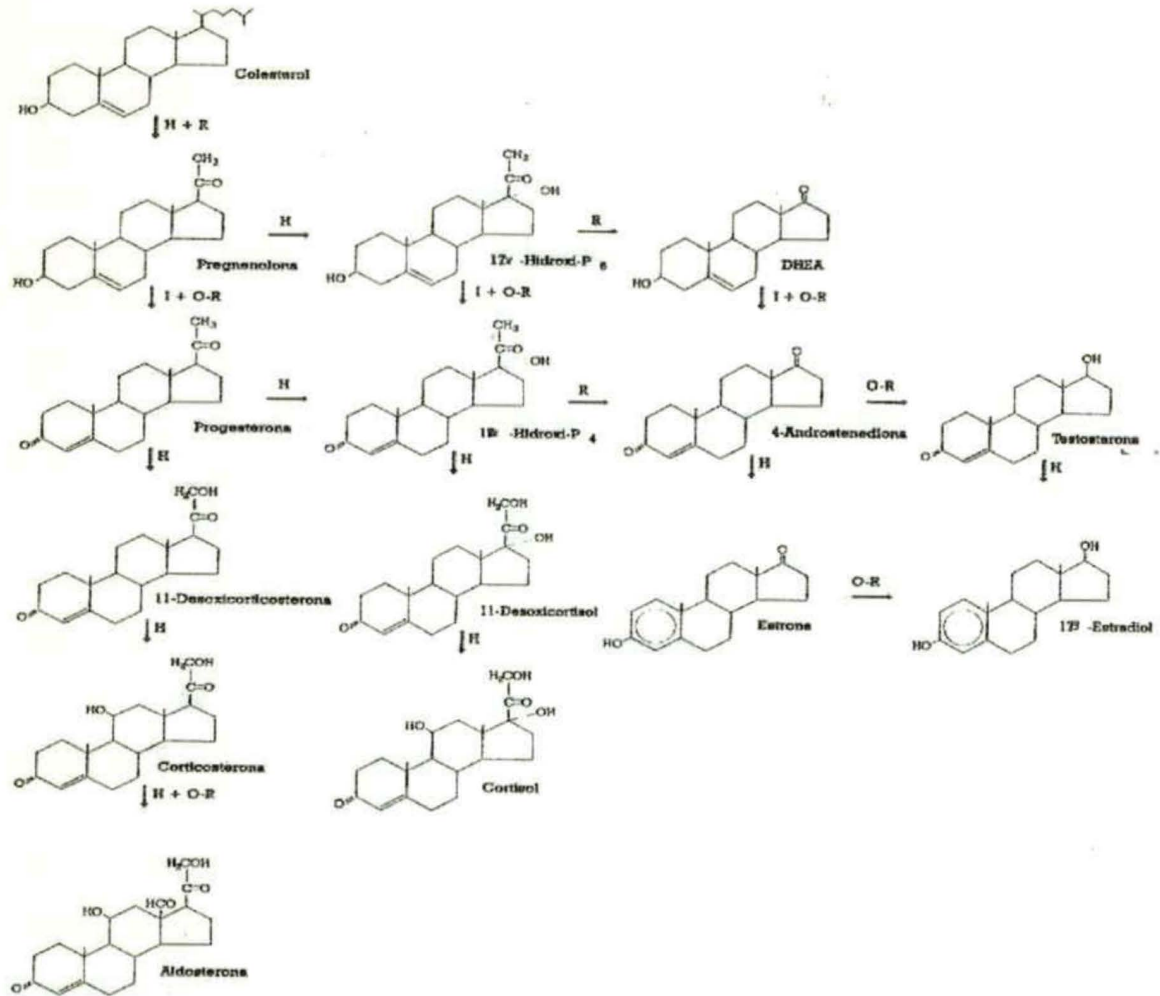
La Figura 3 resume la biosíntesis de esteroides.

I-4 Control endócrino de la esteroidogénesis

Si bien distintas hormonas están involucradas en la regulación de la síntesis de esteroides en los diferentes tejidos mencionados, aquí nos limitaremos a describir el control endócrino de la producción de testosterona y de glucocorticoides, que es ejercido fundamentalmente por la **hormona luteinizante (LH)** y **hormona adrenocorticotrófica, (ACTH)** respectivamente.

En las células de la **pars distalis** de la adenohipófisis o hipófisis anterior se sintetizan la LH y la hormona folículo estimulante (FSH). Ambas son glicoproteínas, con peso molecular aproximado de 32 kDa, constituidas por dos subunidades peptídicas; la subunidad α es común a todas las hormonas de esta categoría y la subunidad β que es específica de cada hormona y es responsable de la actividad

FIGURA 3: Biosíntesis de hormonas esteroides



Referencias: **H**: hidroxilación, **O-R**: oxido reducción, **R**: ruptura de la cadena hidrocarbonada, **I**: isomerización, **DHEA**: dehidroepiandrosterona.

biológica única. ACTH, LH y FSH actúan mediante la unión a sus receptores de membrana en las células esteroidogénicas.

La liberación de gametas, tanto en machos como en hembras, está bajo el control de LH. Esta hormona estimula la síntesis de testosterona por las células de Leydig del testículo, así como la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. En caso de ocurrir la fertilización e implantación, esta última función es asumida por la hormona gonadotrofina coriónica (CG) de origen placentario y estructura similar a LH y FSH. La CG, tiene además la propiedad de ser reconocida por el receptor de LH y puede actuar en células de Leydig estimulando la producción de andrógenos, al igual que LH. Este evento no ocurre en condiciones fisiológicas pero es un válido recurso experimental.

También en la pars distalis de adenohipófisis se sintetizan un grupo de hormonas que derivan de un mismo precursor, llamado pro-opiomelanocortina (POMC) (Eipper y col., 1976; Celis y Scimonelli, 1984), que es procesado en la misma región para dar origen a adrenocoticotrofina (ACTH), α y β melanocito estimulante (MSH), β lipotrofina (LPH) y β endorfinas.

En las células corticotróficas, el POMC se corta para dar origen a ACTH, un péptido de 39 aminoácidos cuya actividad biológica reside en el extremo N-terminal y la β LPH, representando la porción C-terminal del POMC. A su vez, la β LPH puede cortarse en otros fragmentos, la γ LPH y la β endorfina. En los melanocitos, ACTH se procesa para dar origen a α MSH y a CLIP (corticotropin-like peptide). ACTH se une a su receptor específico en células de ZF de glándula adrenal para estimular la biosíntesis de glucocorticoides (Hechter y col., 1951).

I-5 Mecanismo de acción de ACTH y LH/CG

Las hormonas ACTH y LH/CG se unen a sus receptores específicos de la membrana celular. Estos pertenecen a una familia muy amplia de receptores, denominada 7 TMS (transmembrane segments), que presentan el extremo amino en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático

(Lefkowitz y col., 1993) y atraviesan la membrana plasmática siete veces. Estos receptores están acoplados a proteínas que se unen a nucleótidos de guanina, llamadas proteínas G, como transductores de señales a través de la membrana citoplasmática (Rodbell y col., 1971).

La estructura del receptor de LH/CG ha sido objeto de estudios extensivos durante los últimos 20 años, pero únicamente fue determinada luego de la clonación de su ARN mensajero en varias especies, entre ellas rata (McFarland y col., 1989), humano (Minegishi y col., 1990) y ratón (Gudermann y col., 1992). A partir de estos estudios se pudo deducir que la secuencia aminoacídica presenta una región citoplasmática rica en serina y treonina, indicando muy posiblemente un sitio de fosforilación. A diferencia de los receptores acoplados a proteína G que unen a ligandos pequeños, el receptor de LH/CG posee en el espacio extracelular una gran porción peptídica de 350-400 aminoácidos que funcionaría como dominio de unión a la hormona.

La estructura del receptor de ACTH bovino, deducida a partir del aislamiento y secuenciación del correspondiente ADN copia (cDNA), comprende una secuencia aminoacídica de 297 residuos de marcada homología (81%) con su contraparte humana (Raikhin y col., 1994). El peso molecular estimado de este receptor, varía entre 40 y 100 kDa según la especie animal estudiada (Ramachandran y col., 1980; Hofman y col., 1988; Penhoat y col., 1993). Dado que el receptor contiene dos sitios de glicosilación, Raikhin y col. atribuyen la diferencia entre estos valores y el calculado a partir de la secuencia aminoacídica (33kDa) a diferente grado de glicosilación del receptor en los tejidos analizados (Raikhin y col., 1994).

Otro aspecto estructural del receptor de ACTH deducido de los estudios de secuencia es la presencia de sitios consenso de fosforilación. El dominio intracelular presenta un sitio de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y otro para la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) (Raikhin y col., 1994).

La unión de las hormonas ACTH y LH/CG a sus receptores específicos produce la activación de la adenil ciclasa, sistema efector activado por una

subunidad estimuladora de la proteína G. Producto de esta activación es el aumento en los niveles intracelulares de AMPc, segundo mensajero que conduce a la activación de la PKA (Roemmerts y col., 1974, Cooke y col., 1976, Podestá y col., 1976 y 1978). La fosforilación de proteínas regulatorias como consecuencia de dicha activación, desencadena la respuesta celular: incremento de la síntesis de esteroides.

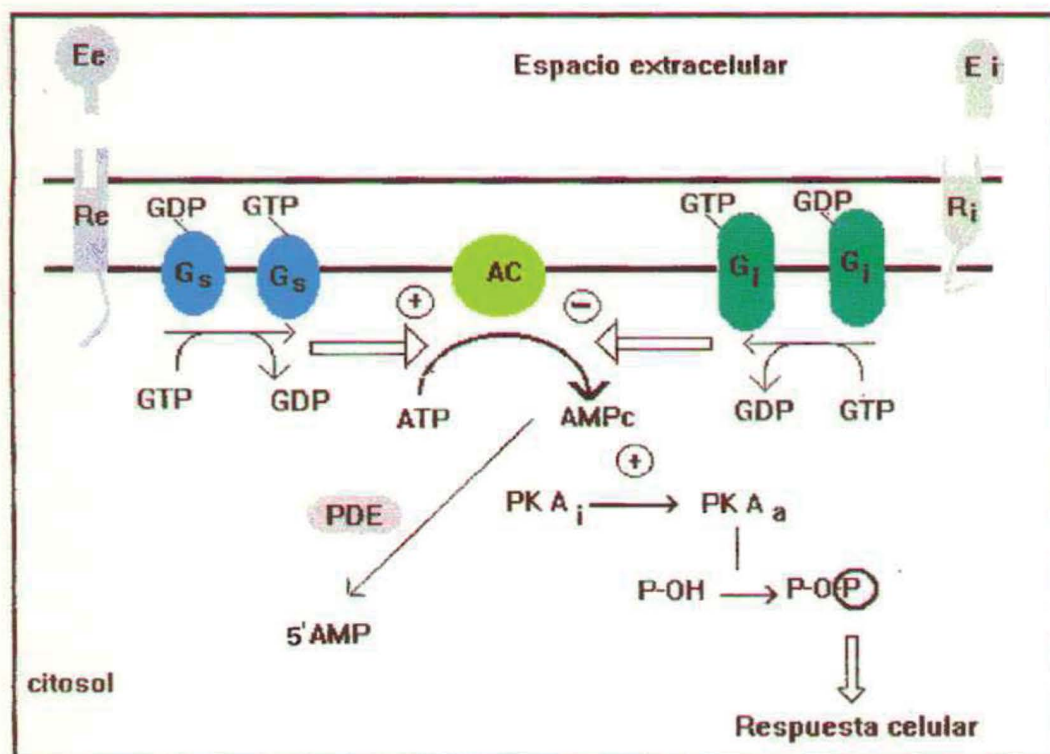
En la Figura 4 se esquematiza la interacción de la hormona (ACTH o LH/CG) con su receptor en la membrana plasmática y la cascada de eventos que se desencadena consecuentemente.

La acción hormonal desencadena efectos agudos (rápidos, 0 a 30 minutos) y crónicos. Los efectos a largo plazo de estas hormonas se reflejan en el incremento de la transcripción de genes que codifican enzimas esteroidogénicas (Simpson y col., 1990). Sin embargo, si bien este efecto mantiene la producción de esteroides a largo plazo, no es la causa de la respuesta esteroidogénica rápida puesto que el nivel de enzimas permanece constante en esta etapa (Koritz y Kumar, 1970). Los efectos agudos de estas hormonas, se atribuyen a la fosforilación PKA-dependiente de proteínas en residuos de serina/treonina que afectan el paso limitante de la vía.

En el proceso de síntesis de esteroides ya descrito en I-3, la reacción de conversión de colesterol a pregnenolona catalizada por el complejo enzimático P450_{SCC}, limita la velocidad de síntesis de esteroides (Karaboyas y Koritz, 1965). Sin embargo, el efecto esteroidogénico agudo no está limitado por el mecanismo catalítico en sí, sino por el acceso de colesterol al sitio activo del complejo P450_{SCC}. Más específicamente el paso limitante y hormonalmente regulado de la esteroidogénesis es el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (Crivello y Jefcoate, 1980; Jefcoate y col., 1987) y éste ocurre en respuesta a la cascada de eventos de fosforilación desencadenada por las hormonas ACTH y LH/CG en las células blanco respectivas.

Al demostrarse que la activación de la PKA es un evento obligatorio en el mecanismo de acción de ambas hormonas esteroidogénicas surge como interrogante cuál (o cuales) es (o son) sustrato(s) de la PKA que media(n) la

FIGURA 4: Interacción hormona-receptor y transducción de señales



El esquema ilustra la transducción de señales a través del sistema de la adenilil ciclasa.

Referencias: Re: receptor estimulador, Ee: efector estimulador (ACTH o LH), Ri: receptor inhibitorio, Ei: efector inhibitorio, AC: adenilil ciclasa, PDE: fosfodiesterasa, P-OH: proteína desfosforilada, P-OP: proteína fosforilada. Otras referencias en el texto.

respuesta hormonal aguda. Un hallazgo importante en el estudio de la regulación aguda de la esteroidogénesis fue comprobar que la misma es dependiente de la síntesis de proteínas "de novo" (Ferguson, 1963; Garren y col., 1965; Davis y col., 1968). Se ha observado que el tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas tales como cicloheximida, previo al estímulo hormonal, evita el incremento de la velocidad de síntesis de esteroides que produce la hormona. Si el tratamiento con estos inhibidores se realiza luego de producido el estímulo, la esteroidogénesis retorna a su velocidad basal dentro de los pocos minutos. Estos resultados son hipotéticamente compatibles con el requerimiento de la síntesis de una "proteína lábil" para los eventos subcelulares que conducen al incremento de la síntesis de esteroides.

Como resultado de las numerosas investigaciones intentando identificar el sustrato endógeno de la PKA, se caracterizó una proteína que reúne las características de factor lábil, con una masa molecular de 30 kDa, que se acumula en la mitocondria de diferentes tejidos esteroidogénicos en respuesta a las hormonas tróficas respectivas (Krueger y Orme-Johnson, 1983; Pon y Orme-Johnson, 1986; Stocco y Sodeman, 1991; Stocco y Ascoli, 1993). Esta proteína se origina por clivaje en la mitocondria de una proteína de 37 kDa (p37). La expresión del ADNc correspondiente a p37 induce la producción mitocondrial de esteroides en ausencia de estimulación hormonal, por lo cual se ha denominado a esta proteína StAR (**S**teroidogenesis **A**cute **R**egulatory) (Clark y col., 1994). Dado que tanto StAR como los productos de su procesamiento mitocondrial se fosforilan en respuesta a las hormonas esteroidogénicas, estas proteínas podrían constituir un blanco para la acción de la PKA.

En diferentes tejidos esteroidogénicos se ha observado que también la liberación y metabolización del ácido araquidónico (AA) son eventos obligatorios en el mecanismo de acción de las hormonas tróficas respectivas (Solano y col., 1987 y 1988; Jones y col., 1987; Johnson y col., 1991; Wade y col., 1994). En nuestro laboratorio hemos purificado a partir de ZF de corteza adrenal de rata una fosfoproteína capaz de estimular la producción mitocondrial de esteroides a través de un mecanismo que involucra la liberación de AA (Paz y col., 1994), a la cual

hemos denominado ARTIST (**A**rachidonic acid **R**elated Thioesterase Involved in **S**teroidogenesis) (Finkielstein y col., 1998) dado que la secuencia de su ADNc resultó 100 % homóloga a una acil-CoA tioesterasa específica para ácidos grasos de cadena larga incorporada al GeneBank (Svensson y col., 1998). Se ha observado que tanto el grado de fosforilación como la actividad de ARTIST se regulan por mecanismos ACTH- y PKA-dependientes. Incluso la secuencia del ADNc de ARTIST revela sitios de fosforilación para diferentes quinasas, de modo que esta proteína novel cumple los requisitos como para ser considerada otro de los sustratos de la PKA involucrados en la regulación del paso limitante de la esteroidogénesis.

Como ya se mencionó anteriormente, la activación de la PKA, como la liberación y metabolización del AA, son eventos obligatorios en la producción de hormonas esteroideas. Surge entonces que en los sistemas productores de esteroideas, la regulación hormonal de la esteroidogénesis depende de la fosforilación en residuos de serina/treonina de proteínas con la capacidad de estimular el paso limitante de la vía. Dado que el grado de fosforilación de las proteínas celulares resulta de la actividad concertada de proteínas quinasas y fosfatasas, se deduce que las hormonas esteroidogénicas modifican la velocidad de síntesis de esteroideas alterando el fino balance que existe entre la actividad de las mismas.

I-6 El rol del citoesqueleto en la esteroidogénesis

Las células eucariotas tienen un citoesqueleto que les confiere capacidad de movimiento, transportar sustancias de un lado a otro de la célula y adoptar una variedad de formas celulares. Las diversas actividades de esta compleja red intracelular dependen de tres tipos de proteínas: los **filamentos de actina** o microfilamentos, los **microtúbulos** y los **filamentos intermedios**. Cada tipo de filamento está formado por una subunidad proteica diferente: actina, para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos y una familia de proteínas

fibrosas como la vimentina, laminina y citoqueratina para los filamentos intermedios. Estos componentes se asocian a su vez con numerosas proteínas accesorias que permiten que el mismo tipo de filamento participe en funciones distintas en diferentes regiones de la célula. Algunas de estas proteínas actúan como adaptadores entre los filamentos y otras estructuras celulares, como la membrana plasmática y la mitocondria, otras regulan la tasa de polimerización de los filamentos de actina y microtúbulos.

Los filamentos de actina participan, entre otros eventos, en el establecimiento de contactos focales de adhesión entre las células y la matriz extracelular. La formación de un contacto focal ocurre cuando proteínas glicosiladas de la matriz extracelular (como fibronectina) se unen a moléculas de integrina y causa su agrupación en *clusters* con el consiguiente rearrreglo de las proteínas intracelulares que contactan a los filamentos de actina.

Los microtúbulos conforman la estructura principal de cilios y flagelos y también conforman los husos mitóticos en la división celular. Los filamentos intermedios, por su parte, proveen resistencia ante el *stress* mecánico y se encuentran preponderantemente en células que normalmente están bajo este tipo de procesos, como por ejemplo las células epiteliales.

Con el fin investigar la función del citoesqueleto en diversos procesos celulares, como por ejemplo la secreción de esteroides, se han utilizado diferentes compuestos que modifican su estructura. Uno de ellos es la citocalasina B, la cual causa la despolimerización de los microfilamentos. En células adrenocorticales humanas este compuesto inhibe la secreción de cortisol estimulada por ACTH actuando en un sitio posterior a la activación de la adenilil ciclase (Feuilloley y col., 1994) y un efecto similar produce en células de la línea Y1 (Mrotek y col., 1982), una línea celular derivada de tumor adrenal murino. En ambos tipos celulares la citocalasina B bloquea la acumulación de colesterol en la mitocondria, sugiriendo que los microfilamentos están involucrados en la movilización del colesterol desde el citoplasma a la mitocondria.

Con respecto a la participación de los microtúbulos en la producción de esteroides se ha observado que la vinblastina, un agente antimicrotubular, reduce

la respuesta esteroideogénica a ACTH en células adrenocorticales de rata, pero no afecta la respuesta a análogos del AMPc (Feuilloley y col., 1986). Este resultado, coincidente con lo que ocurre en células adrenocorticales humanas (Feuilloley y col., 1994), estaría sugiriendo que, tanto en anfibios como en humanos, los microtúbulos están involucrados en algún sitio del mecanismo de transducción anterior a la formación de AMPc.

En células de Leydig se ha observado, mediante microscopía electrónica, una fuerte asociación a través de los filamentos intermedios entre la mitocondria y gotas lipídicas con alto contenido de colesterol esterificado (Almahbobi y col., 1993), sugiriendo un posible mecanismo por el cual el colesterol puede ser transportado desde gotas lipídicas hasta la membrana externa mitocondrial. De acuerdo con esta hipótesis, en estas células los filamentos intermedios estarían involucrados en el mismo proceso en el que están involucrados los microfilamentos en células adrenocorticales.

Los trabajos citados demuestran que el reordenamiento correcto del citoesqueleto parece tener un papel importante en la modulación de la respuesta hormonal. Sin embargo, aún cuando numerosos estudios, además de los ya citados, indican que los componentes del citoesqueleto tienen una importante participación en el proceso de secreción de esteroides, es conveniente mencionar que esta función es marcadamente diferente según la especie estudiada o si se trata de células normales o tumorales (Feuilloley y Vaudry, 1996).

II- FOSFATASAS DE PROTEÍNAS

II-1 Proteínas fosfatasas: Generalidades y clasificación

La fosforilación de proteínas es un proceso clave en la regulación de las funciones celulares, entre ellas el metabolismo energético, la división y el crecimiento celular.

Una amplia variedad de estímulos, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, ejercen su acción desencadenando una cascada de reacciones que conduce a la fosforilación de proteínas regulatorias con una función clave en los procesos controlados por estos estímulos. Un claro ejemplo de cómo este proceso participa en la acción hormonal ya fue discutido en relación al mecanismo de acción de las hormonas ACTH y LH/CG. En este caso la fosforilación de proteínas regulatorias permite incrementar el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna para su utilización en la síntesis de esteroides.

El grado de fosforilación de las proteínas depende del balance neto entre las actividades de dos tipos de enzimas, proteínas quinasas y proteínas fosfatasas. En principio, se consideraba que en los procesos regulados por fosfoproteínas, las proteínas fosfatasas funcionaban meramente para desactivar los mismos. Sin embargo, el concepto actual es completamente diferente, ya que un mayor conocimiento sobre estas enzimas ha demostrado que cumplen un rol de la misma importancia que su contraparte, las proteínas quinasas. Es por ello que para conocer en detalle cómo se realiza la regulación de todo proceso mediado por fosfoproteínas es necesario identificar los dos tipos de enzimas involucrados en el proceso, así como también los mecanismos regulatorios de las mismas.

Las proteínas fosfatasas se clasifican teniendo en cuenta el residuo aminoacídico del cual remueven el fosfato, es decir, conforme a un criterio equivalente al que rige la clasificación de las proteínas quinasas. Por lo tanto, las proteínas fosfatasas se clasifican en: serina/treonina fosfatasas y tirosina fosfatasas.

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) constituyen una familia de más de 70 miembros de estructura diferente. Aún cuando presentan diversidad tanto en tamaño como en organización estructural, la presencia en cada isoforma de al menos un segmento conservado de 240 aminoácidos (dominio catalítico) demuestra un origen evolutivo común (Charbonneau y Tonks, 1992). La combinación del dominio catalítico con una amplia variedad de *motifs* explica la diversidad existente entre las PTPs descritas. Esta diversidad estructural se refleja en la diversidad de procesos celulares que controlan y en la diferente localización subcelular que presentan.

Las PTPs existen como formas transmembranas (RPTP, **R**eceptor like **P**rotein **T**yrosin **P**hosphatase) y no transmembrana (no-TM) (Walton y Dixon, 1993; Neel y Tonks, 1997).

Las fosfatasas de especificidad dual (DSPs) y las fosfatasas de bajo peso molecular (fosfatasas ácidas) (LMPs) presentan similitud de secuencia con las PTPs "clásicas", pero esta similitud está confinada al dominio catalítico o de PTP. Las DSPs, entre las cuales se incluye a cdc25A, B y C y las MAP quinasa fosfatasas MKP-1 y PAC-1, generalmente desfosforilan fosfotirosina y fosfoserina/fosfotreonina en secuencias consenso específicas. Las LMPs están aún menos relacionadas estructuralmente con las PTPs, la homología se restringe al sitio esencial para la catálisis (Neel y Tonks, 1997).

Las PTPs tipo RPTP presentan dominios extracelulares homólogos a otras proteínas. En la variedad de secuencias de estos dominios reside principalmente la diversidad estructural de estas enzimas, ya que todas presentan marcada homología de secuencia en los dominios intracelulares. Así por ejemplo existen RPTPs con dominios extracelulares de marcada homología con otras proteínas conocidas como la fibronectina tipo III, moléculas de adhesión celular con dominios MAM (estos dominios se llaman así por estar presentes en las proteínas **m**eprina, **A**5 de xenopus, y **mu**), anhidrasa carbónica (AC) e inmunoglobulinas, entre otras.

El grupo de las PTPs del tipo no-transmembrana incluye las PTPs llamadas SHP1 y 2, también llamadas PTP1C y PTP1D. Estas enzimas se caracterizan por la presencia de dos dominios SH2 en su región N-terminal. Los dominios SH2 se encuentran en varias tirosina quinasas del tipo no-receptor, como la proteína pp60^{v-src} y otras proteínas citoplasmáticas que actúan en transducción de señales tales como como la fosfolipasa C γ y la fosfatidil inositol 3 quinasa. Otras PTPs no-transmembrana contienen secuencias de marcada homología con la proteína de eritrocito banda 4.1 o secuencias PEST (secuencias que contienen el *motif* Pro-Glu-Ser-Thr). En la Figura 5 se esquematiza la estructura de algunos de los miembros de la familia de las PTPs.

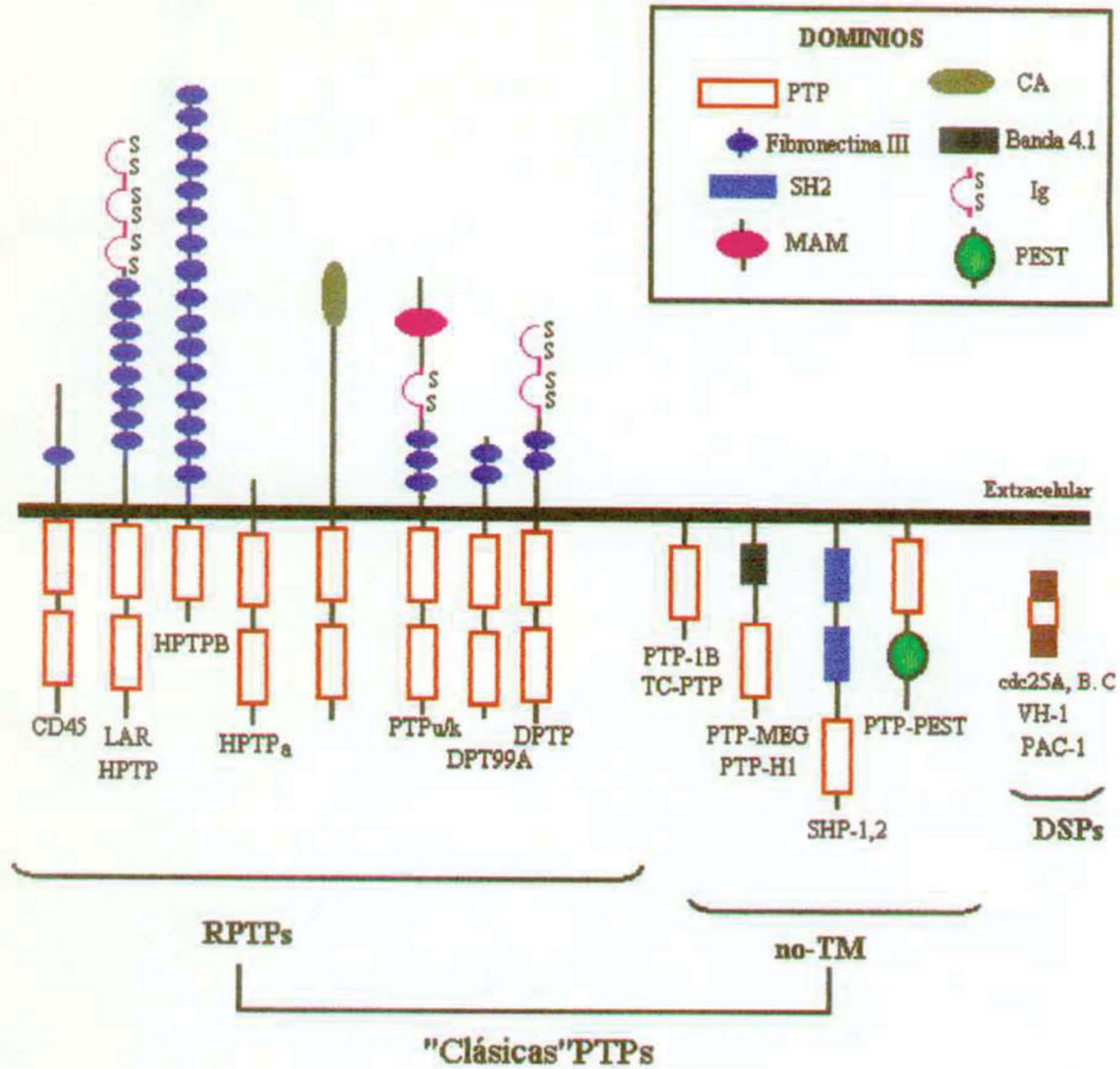
II-2.1 Estructura y función del dominio catalítico de las PTPs

El dominio de PTP presenta al menos 6 regiones altamente conservadas. Particularmente importante es un segmento de 11 residuos que constituye el sitio catalítico. Este contiene una cisteína que es esencial en el mecanismo catalítico (Walton y Dixon, 1993): durante la catálisis, el residuo de cisteína reacciona con el grupo fosfato del sustrato y forma un intermediario tiofosfato (Neel y Tonks, 1997). La participación del grupo sulfhidrilo en el mecanismo catalítico explica el efecto inhibitorio que ejercen los agentes oxidantes tales como los aniones del vanadio (ortovanadato, pervanadato) y del molibdeno (molibdato) (Swarup y col., 1982).

II-2.2 Regulación de la actividad de las PTPs

Los miembros de la familia de las PTPs muestran actividades específicas mucho mayores que las de las tirosina quinasas (hasta 3 órdenes de magnitud mayor), y alta afinidad por su sustrato (Tonks y col, 1988b y 1988c; Tonks y col., 1990). Estas propiedades permiten atribuir a las PTPs la capacidad de actuar como una potente barrera a la acción de las tirosina quinasas *in vivo*. En base a este concepto es que se sugiere que mecanismos regulatorios muy finos controlan la actividad de las PTPs.

FIGURA 5: Estructura de algunos miembros de la familia de las PTPs



Fuente: Neel, B. G. y Tonks, N. K., 1997

Al menos tres familias de moléculas poseen actividad de PTP. Las PTP clásicas comprenden dos grupos de PTP, las RPTP (moléculas transmembrana) y las no-TM (moléculas no transmembrana). El tercer grupo está formado por las PTP de especificidad dual (DSPs). Las PTP clásicas poseen, además de uno o dos dominios catalíticos conservados, una variedad de secuencias no catalíticas homólogas a secuencias presentes en otras proteínas.

Para las RPTP, se ha postulado la modulación de la actividad por unión de un ligando al dominio extracelular, un mecanismo que resulta obvio teniendo en cuenta la estructura de este tipo de moléculas. La mayoría de las RPTP contienen dos dominios de PTP (1 y 2). De estos dos dominios, generalmente sólo el dominio más próximo al extremo amino terminal, dominio 1, tiene actividad enzimática significativa (Neel y Tonks, 1997). El dominio catalítico 2 de las RPTP podría intervenir en la regulación por ligandos de estas enzimas. Esta hipótesis surge del hecho de haber comprobado que la PTP α , una RPTP que consta simplemente de un pequeño segmento transmembrana y dos dominios catalíticos, cristaliza como un dímero. En esta estructura dimérica, una porción del dominio catalítico de cada monómero se inserta en el dominio catalítico del otro monómero de manera que en esta estructura el sustrato no puede interactuar con el sitio activo (Bilwes y col., 1996). A partir de esta observación se ha postulado la dimerización inducida por ligandos como mecanismo regulatorio para las RPTP: la interacción del dominio extracelular con un ligando específico podría inducir la formación del dímero, "bloquear" el sitio catalítico y, consecuentemente inhibir la actividad enzimática. Con respecto a este mecanismo regulatorio corresponde aclarar que no se ha observado la formación de dímeros *in vivo*, si bien se han obtenido algunas evidencias mediante experimentos en los que se estimulan con EGF (factor de crecimiento epidérmico) células transfectadas con proteínas quiméricas construidas con el receptor de EGF y CD45 (Neel y Tonks, 1997; Desai y col., 1993), una RPTP de células T. Aún así debe enfatizarse que no existen evidencias directas que permitan sustentar la hipotética regulación de las RPTP mediante la interacción con ligandos específicos. Mas aún, se desconocen ligandos específicos para estas enzimas. Cuando se evalúa la actividad de las RPTPs solubilizadas y purificadas, y por lo tanto en ausencia de ligandos, se observa que despliegan considerable actividad frente a sustratos artificiales, a diferencia de lo que se observa con las proteínas quinasas tales como el receptor de EGF. Esta observación sugiere que este tipo de PTPs pueden ser enzimas constitutivamente activas *in vivo* (Tonks y col., 1990; Daum y col., 1991). Es posible que la interacción con ligandos produzca la inhibición de la actividad de las RPTPs, en

lugar de activación, o que permita modular la actividad controlando su localización subcelular en la membrana plasmática, restringiendo así su interacción con el sustrato o con otros factores regulatorios.

La fosforilación de las PTPs, tanto en residuos de serina/treonina como de tirosina constituye un mecanismo adicional de regulación de la actividad de las mismas. Una de las PTPs que se regula por fosforilación en tirosina es la tirosina fosfatasa no-TM PTP1C. En linfocitos se ha observado que el tratamiento con insulina estimula la fosforilación de esta enzima. Este efecto es mediado por la actividad de tirosina quinasa del receptor de insulina y resulta en un incremento de la actividad de la enzima. Por otra parte, PTP1C tiene la capacidad de unirse al receptor de insulina sólo cuando éste está fosforilado, por lo que se postula que la activación del receptor de insulina puede promover su interacción con PTP1C y la activación de la misma por fosforilación en residuos de tirosina. De acuerdo con estos resultados, PTP1C regularía negativamente las acciones de la insulina (Uchida y col., 1994). La actividad de PTP1C también se regula por fosforilación en residuos de serina/treonina por acción de PKC. Esta modificación, observada en neutrófilos, inhibe la actividad de la enzima (Brumell y col., 1997).

Otro miembro de la familia de las PTPs que se regula por fosforilación es la PTP1B. Se ha observado que esta enzima se fosforila en varios residuos de serina/treonina y esta modificación reduce la actividad enzimática. Distintas quinasas como PKA, PKC y cdc2 quinasa catalizan la fosforilación *in vitro* (Flint y col., 1993). *In vivo*, el grado de fosforilación de PTP1B se altera a lo largo del ciclo celular, observándose incremento de la fosforilación en residuos de serina durante la mitosis (Shifrin y col., 1996). Sin embargo, el efecto de la fosforilación sobre la actividad enzimática de la PTP1B genera controversia, ya que mientras Flint y col. indican una disminución del 30% de actividad durante la mitosis (Flint y col., 1993), Schievella y col. observan un ligero aumento (Schievella y col., 1993).

La PTP1B también se regula por fosforilación en residuos de tirosina, como demuestran experimentos *in vivo* en fibroblastos de rata, en respuesta ante la estimulación con insulina (Bandyopadhyay y col., 1997).

Brautigan y Pinault observaron que la estimulación de células intactas de riñón de mono (línea celular CV-1) con distintos agentes que activan la PKA y la PKC produce un incremento de la actividad de una PTP de membrana de 150 kDa (Brautigan D. y Pinault, F., 1991).

Se ha descrito la participación de otro miembro de la familia de PTPs, la PTP1D, en el mecanismo de acción de la insulina a través de su interacción con el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1). Este sustrato fosforilado en tirosina por el receptor de insulina activado, se asocia con proteínas que contienen dominios SH2, entre ellas PTP1D (Kuhné y col., 1993). La asociación del IRS-1 con PTP1D lleva a la activación de la MAP quinasa involucrada en las acciones mitogénicas de la insulina a través del reclutamiento y asociación con otras proteínas. En este caso, PTP1D no se fosforila a diferencia de lo que ocurre con las PTPs mencionadas anteriormente. Estos resultados indican la amplia gama de posibles regulaciones a las que se hallan sujetas las distintas PTPs, dejando en claro su importancia en el mantenimiento de las funciones normales de la célula, como división celular, diferenciación y metabolismo.

II-3 Proteínas serina/treonina fosfatasas

Las proteínas serina/treonina fosfatasas (PPs) fueron clasificadas en principio en base a la especificidad de sustratos y a la sensibilidad hacia diferentes inhibidores. Según este criterio bioquímico de clasificación, originariamente se distinguieron en mamíferos 4 tipos de subunidades con actividad de PPs: PP1, PP2A, PP2B y PP2C (Shenolikar e Ingebritsen, 1984). Posteriormente, se identificaron isoformas de cada una de estas. La PP1 desfosforila la subunidad β de la fosforilasa quinasa y es inhibida por concentraciones nanomolares de dos inhibidores endógenos termoestables, el inhibidor 1 (I 1) y el inhibidor 2 (I 2). Las de tipo PP2 desfosforilan la subunidad alfa de la fosforilasa quinasa y pueden ser subdivididas a su vez en distintos tipos teniendo en cuenta el requerimiento de diferentes cationes para exhibir actividad. PP2A desfosforila sustratos en ausencia

de cationes divalentes mientras que PP2B y PP2C son, respectivamente, Ca^{++} y Mg^{++} dependientes. El siguiente cuadro resume esta clasificación (Shenolikar e Ingebritsen, 1984).

Serina/Treonina fosfatasas (PPs): Clasificación				
PPs	Inhibición por I 1 e I 2	Especificidad por fosforilasa quinasa	Especificidad de sustrato	Reguladores
1	Si	Subunidad β	Amplia	I1, I2
2A	No	Subunidad α	Amplia	Desconocido
2B	No	Subunidad α	Limitada	Ca^{++}, calmodulina
2C	No	Subunidad α	Amplia	Mg^{++}

La actividad de las cuatro variantes de PPs y sus isoformas dan cuenta prácticamente de la totalidad de la actividad de PPs presentes en extractos celulares de mamíferos. Estas enzimas actúan sobre fosfoproteínas involucradas en el metabolismo (como síntesis y degradación del glucógeno, síntesis de ácidos grasos, de colesterol, de proteínas) y en el control del ciclo celular, entre otros procesos.

Con respecto a la regulación de estas enzimas, el estado de fosforilación de las mismas es uno de los mecanismos involucrados. Dos inhibidores ya mencionados se asocian a PP1: I1 e I2. El I1 se fosforila por acción de PKA en un residuo de serina y la forma fosforilada de este péptido es un potente inhibidor de PP1 (Cohen y col., 1977; Cohen y col. 1978).

La PP2A es un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica (C), una subunidad regulatoria (A) y una de las varias subunidades "B" descriptas. También se han descripto las isoformas AC y C (Mayer-Jackel y col., 1993). Estudios *in vitro* indican que la subunidad catalítica de la PP2A sufre modificaciones post-traduccionales como fosforilación en residuos de tirosina

(Chen y col., 1992; Guo y col., 1993; Chen y col., 1994; Barnes y col., 1995) y treonina (Guo y col., 1993). La fosforilación en tirosina regula la actividad de la enzima, ya que se ha demostrado que en células de músculo esquelético de rata la exposición a insulina desencadena la fosforilación de la PP2A en dicho residuo y disminuye la actividad de la enzima (Begum y col., 1996).

En los ejemplos mencionados algunos miembros de las PPs se regulan por fosforilación en tirosina, por lo tanto su actividad es modulada por la actividad de PTPs y de tirosina quinasas. Recíprocamente, para el caso de las PTPs también existen ejemplos de fosforilación en residuos de serina/treonina, por lo cual la regulación de la actividad de PPs y de serina/treonina quinasas tiene efecto sobre la actividad de PTPs. Estos circuitos explican por qué aquellos agonistas que desencadenan la activación de PPs o serina/treonina quinasas pueden desencadenar la desfosforilación o la fosforilación respectivamente en estos residuos de una determinada PTP. De manera similar, ciertos agonistas, al regular la actividad de PTPs o de tirosina quinasas, pueden conducir a la activación de aquellas PPs que se regulan por fosforilación en tirosina.

Estas conclusiones son particularmente interesantes en relación con el mecanismo de acción de las hormonas que regulan la esteroidogénesis. Estos mecanismos podrían involucrar la regulación de PTPs por eventos de fosforilación en residuos de serina/treonina. Incluso de existir un "cross-talk" entre sistemas en los que participa una serina/treonina quinasa como la PKA y las PTPs podría contribuir a la regulación de la respuesta hormonal en estos sistemas, es decir la síntesis de esteroides.

III- PARTICIPACION DE LAS FOSFATASAS EN LA ESTEROIDOGENESIS

III-1 La desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina como posible evento integrante del mecanismo de acción de ACTH

Las hormonas ACTH y LH/CG constituyen dos ejemplos bien caracterizados de hormonas que generan una respuesta celular mediante mecanismos que involucran la fosforilación de proteínas, con la consiguiente modulación de la bioactividad de proteínas específicas. Teniendo en cuenta que el grado de fosforilación de una proteína depende del balance neto entre la actividad de proteínas quinasas y proteínas fosfatasas, conocer acerca de las fosfatasas de proteínas que intervienen en este balance, para el caso particular de las hormonas mencionadas, debe ser considerado con la misma importancia que la atribuida a la PKA. Sin embargo, son muy limitadas las investigaciones realizadas con el objetivo de caracterizar las fosfatasas de proteínas, y en particular las PTPs, involucradas en la cascada de señales que desencadenan dichas hormonas esteroideogénicas.

Los estudios realizados por Aharoni y col. empleando distintos inhibidores de fosfatasas de proteínas (Aharoni y col., 1993) incluyeron el uso de pervanadato (PV) y óxido de fenilarsina (PAO), dos inhibidores de PTPs. Los resultados obtenidos muestran que la progesterona producida por células de la granulosa en respuesta a FSH y a agentes que incrementan los niveles intracelulares de AMPc aumenta significativamente cuando la incubación se realiza en presencia de PV (1mM) o de PAO (30 nM). Si bien este efecto puede detectarse luego de 2 horas de estimulación en presencia de los inhibidores, es mucho más significativo cuando se realiza con células que previamente fueron estimuladas durante 46 hs en ausencia de los inhibidores de PTPs (Aharoni y col., 1993). Dado que el pervanadato también indujo cambios en la morfología celular y modificación de la estructura del citoesqueleto, los autores postulan que el incremento en la esteroideogénesis por el PV es debido, al menos en parte, a un aumento de la

movilización del colesterol a la mitocondria, producido por dicho rearrreglo en el citoesqueleto.

Un estudio realizado en células Y1 con el fin de dilucidar los eventos que conectan la activación de la PKA con los cambios morfológicos que induce ACTH en estas células (Han, J. y Rubin, C., 1996), permite inferir la participación de eventos de desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina como evento integrante del mecanismo de acción de esta hormona. Estas investigaciones mostraron que ACTH y AMPc causan la rápida desfosforilación en tirosina de la **paxilina**, una proteína de adhesión focal. Dado que este evento es inhibido por el PV, los autores estiman que puede ser consecuencia de la activación hormonal de PTPs (Han, J. y Rubin, C., 1996). Un trabajo más reciente mostró que ACTH desencadena la desfosforilación de la paxilina también en células de ZF de origen bovino (Vilgrain y col., 1998). Sin embargo ninguno de estos estudios incluyó la valoración de la actividad de PTP como tampoco el análisis de los efectos de la inhibición de PTPs sobre la respuesta esteroidogénica.

De acuerdo con lo expuesto, aún no existe un panorama completamente claro acerca de la posible participación de los eventos de desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina en el mecanismo de acción de hormonas que regulan la esteroidogénesis.

III-2 Estudios sobre el efecto de la inhibición de PPs sobre la producción de esteroides estimulada por ACTH

También para el caso de las PPs la información disponible acerca de su participación en el mecanismo de acción de hormonas que regulan la esteroidogénesis es limitada y controversial en muchos casos.

La subunidad catalítica de la PP1 forma complejos con distintas subunidades regulatorias, estas interacciones modifican su actividad o determinan una localización particular (Shenolikar, S., 1994). Una de estas subunidades regulatorias es el inhibidor 1, el cual se asocia con la subunidad catalítica de PP1

y produce su inhibición luego de fosforilarse por acción de PKA (Huang, F.L. y Glimsmann, W.H., 1976). Iyer y col. demostraron que, en corteza adrenal de rata, ACTH produce la fosforilación del inhibidor 1 en un modo que se correlaciona con el tratamiento hormonal en tiempo y dosis (Iyer y col., 1988). Estos resultados indicarían que los procesos de desfosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina, al menos los mediados por PP1, resultarían inhibidos por la acción de ACTH.

La identificación de un número de potentes inhibidores no-peptídicos de PPs facilitó en gran medida muchos de los estudios realizados en la última década con el fin de determinar la participación de estas enzimas en distintas funciones celulares. De estos compuestos, el más conocido es el ácido okadaico, un ácido graso poli-éter aislado por primera vez de una esponja marina (Tachibana y col., 1981). Otros inhibidores son la caliculina A y la microcystina, entre otros, los que inhiben de manera equipotente a la PP1 y PP2A (Ishihara y col., 1989; MacKintosh y col., 1990). Los trabajos realizados con el fin de determinar la participación de PPs en el mecanismo de acción de ACTH que se han realizado hasta el presente incluyeron el uso de los inhibidores mencionados. Así por ejemplo, Azhar y col. demostraron que en células de adrenal de rata, cultivadas por períodos de tiempo que variaron entre 3 y 24 hs., el ácido okadaico inhibe la producción de corticosterona estimulada por lipoproteínas (Azhar y col., 1991). Los autores observaron que la adición al medio de cultivo de lipoproteínas incrementa 25 a 30 veces el efecto de ACTH sobre la producción de esteroides y que el ácido okadaico interfiere con la potenciación de éstas sobre la esteroidogénesis estimulada por acción hormonal. En contraste, el ácido okadaico no afecta la magnitud de la respuesta a ACTH sola. Basados en estos resultados los autores concluyen que una actividad de PPs sensibles a ácido okadaico puede estar involucrada en la utilización del colesterol derivado de las lipoproteínas para la síntesis de esteroides (Azhar y col., 1991).

En contraposición a los resultados descriptos precedentemente, Sayed y col. comprobaron que el ácido okadaico y la caliculina A, en concentraciones de 100 y 10 nM respectivamente, reducen significativamente la producción de

corticosterona estimulada durante 2 hs. tanto por ACTH como por un análogo permeable del AMPc o por forskolina en células de ZF de corteza adrenal de rata (Sayed y col., 1997). Utilizando el mismo inhibidor se obtuvieron resultados similares al evaluar la producción de aldosterona estimulada por estos agentes en ZG de corteza adrenal de rata. Por otro lado, tanto en ZF como en ZG, los inhibidores utilizados no afectan la producción basal de esteroides ni la sostenida a partir de un análogo del colesterol permeable a la mitocondria, 22R-OHcolesterol (Sayed y col., 1997). En base a estos resultados los autores sugieren que las PPs pueden estar involucradas en los mecanismos intracelulares a través de los cuales ACTH regula la esteroidogénesis, participando en un punto localizado después de la formación de AMPc y previo al sitio donde se escinde la cadena lateral del colesterol.

Es evidente que del análisis conjunto de los estudios mencionados no surgen evidencias contundentes acerca de la función y/o participación de las PPs en el mecanismo de acción de ACTH. No obstante conviene mencionar que diferentes condiciones experimentales utilizadas en los estudios presentados, como por ejemplo tiempo de exposición a los inhibidores, condiciones de cultivo, entre otros, pueden afectar de manera diferente la respuesta evaluada.

III-3 Efecto de los inhibidores de PPs en el mecanismo de acción de FSH y LH

La bibliografía describe la acción de los inhibidores de PPs sobre la producción de esteroides estimulada por FSH y LH.

En un estudio realizado con cultivos primarios de células de la granulosa de ovario, donde se analizó el efecto de inhibidores de PTPs y de PPs sobre la producción de progesterona estimulada por forskolina, Aharoni y col no detectaron ningún efecto de la caliculina A (10 nM) ni del ácido okadaico (1000 nM) sobre la magnitud de la respuesta esteroidogénica (Aharoni y col., 1993). Estos resultados sugieren que, en el sistema analizado, la esteroidogénesis no depende de la

actividad de PP1/PP2A. Los resultados de otro trabajo realizado con células de la granulosa en cultivo indicarían que el bloqueo de la actividad de PP1/PP2A por el ácido okadaico potenciaría la acción de la FSH (Gonzalez Reyes y col., 1997). Este estudio muestra que este inhibidor, en concentraciones superiores a 0,1 nM, aumenta significativamente la producción de progesterona estimulada por FSH o por agentes que incrementan el AMPc. La magnitud del efecto depende de la dosis del inhibidor (0,1-1nM) pero, es importante destacar, que es necesario un período de incubación de 12 hs. o mayor para que el aumento de producción de progesterona estimulada por FSH se incremente significativamente por acción del ácido okadaico. En función de estos resultados Gonzalez Reyes y col. han planteado que la actividad de PP1/PP2A puede ser importante para regular el nivel de fosforilación de proteínas implicadas en la esteroidogénesis estimulada por activación de la PKA en estas células.

Abayasekara y col. emplearon diferentes inhibidores de PPs, entre ellos la caliculina A y el ácido okadaico, para analizar el posible rol de estas enzimas en la producción de esteroides estimulada por LH en células luteales de rata (Abayasekara y col., 1996). En este trabajo, en el que la respuesta esteroidogénica se evaluó luego de incubar las células por un período de dos horas, se demostró que concentraciones de caliculina A superiores a 10 nM reducen significativamente la producción de esteroides estimulada por una dosis máxima de LH hasta niveles comparables a la registrada en condiciones basales.

Para analizar los efectos del ácido okadaico se evaluó la respuesta esteroidogénica en presencia de este inhibidor en concentraciones comprendidas entre 10 y 5000 nM y nuevamente observaron inhibición de la respuesta esteroidogénica a la hormona. En este caso el efecto fue significativo a partir de 1000 nM pero el grado de inhibición máximo observado (aproximadamente 40% de inhibición) fue menor al registrado en presencia de caliculina A. Ambos inhibidores también interfirieron en la producción de progesterona estimulada por un análogo permeable del AMPc y no alteraron la producción basal de esteroides ni la sostenida a partir de 22R-OHcolesterol. A partir de estos resultados los autores sugieren que un circuito de fosfo-desfosforilación de una proteína específica y aún

no identificada, sustrato de las PPs sensibles a los inhibidores empleados, puede regular el transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna (Abayasekara y col., 1996). De acuerdo con esta hipótesis, la forma desfosforilada de la proteína aún desconocida puede contribuir al transporte de colesterol hacia el sitio de la mitocondria donde se localizan las enzimas de la biosíntesis de esteroides. Como ocurre con las investigaciones realizadas con células adrenocorticales, al analizar en conjunto las investigaciones llevadas a cabo para estudiar la participación de PPs sobre el mecanismo de acción de FSH y de LH, surgen resultados contradictorios con respecto a la posible participación de PP1/PP2A en el mecanismo de acción de las hormonas mencionadas. Nuevamente hay que considerar que las diferencias en los resultados obtenidos pueden deberse a distintas condiciones experimentales.

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es analizar la participación de los procesos de desfosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina y tirosina en el mecanismo de acción de las hormonas ACTH y LH, en ZF de corteza adrenal y en células de Leydig de testículo de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

I- MATERIALES

I-1 Reactivos utilizados

A continuación se indica el origen de los reactivos utilizados: Adrenocorticotrofina (ACTH) y Gonadotrofina Coriónica humana (hCG): Laboratorio Elea; 8Br-adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), 22R-OH colesterol, óxido de fenilarsina (PAO), ortovanadato de sodio, catalasa, p-nitrofenilfosfato (p-NPP), anticuerpo anti-IgG de conejo y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa: Bio-Rad; metilisobutilxantina (MIX), ácido okadaico (OK), caliculina A (CA), albúmina sérica bovina (BSA), histona tipo III-S y subunidad catalítica de la PKA de corazón bovino: Sigma, Co (EEUU); colagenasa/disipasa y tripsina de páncreas bovino: Boehringer Mannheim GmbH; Medio 199, inhibidor de tripsina (soja) y membranas de nitrocelulosa: GIBCO BRL; reactivos de electroforesis: BioRad Laboratories; 9-fluor-11b,17,21-trihidroxi-16a-metilpregna-1,4dieno-3,20diona (dexametasona): Ciba Geigy (Suiza); Proteína A/G Agarosa PLUS: Santa Cruz Biotechnology; anticuerpo policlonal anti-fosfotirosina, anticuerpos monoclonales anti-PTP1B, PTP1C y PTP1D y anti-paxilina: Transduction Laboratories (EEUU). La detección de proteínas específicas en los Western-blot se realizó por quimioluminiscencia (ECL de Amersham).

Todos los otros reactivos comerciales fueron de la mejor calidad disponible.

I-2 Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar (90 días de edad). Las glándulas adrenales o las células de ZF de glándula adrenal fueron obtenidos de animales tratados con dexametasona (10 mg/ml, ad libitum) en el agua de bebida por 16 hs previas al sacrificio (Podestá y col., 1979). Los animales se sacrificaron por decapitación.

II- MÉTODOS

II-1 Estimulación *in vivo* de glándulas adrenales

Luego del tratamiento con dexametasona, los animales se inyectaron con 200 mg de ACTH/kg peso por vía subcutánea y se sacrificaron a los 5, 15 o 30 minutos luego de la inyección. Las glándulas adrenales se removieron, se decapsularon, se desmedularon, se cortaron en cuartos, se homogenizaron y se sometieron al fraccionamiento subcelular, como se describe más abajo.

II-2 Fraccionamiento subcelular

Todos los procedimientos que se indican fueron llevados a cabo a 0-5 °C. Los cuartos de adrenal se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de teflón/vidrio con una solución amortiguadora compuesta por: 10 mM Tris-HCl pH 7,4 conteniendo 270 mM manitol, 2 mM vanadato, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina y 10 µM leupeptina, en la proporción de 0,2 ml de solución/glándula.

Los núcleos y restos de células se removieron por centrifugación del homogenato a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a

9000 x g por 20 min para separar la fracción mitocondrial (sedimento). Por centrifugación del sobrenadante anterior a 105000 x g durante 60 min se separaron la fracción particulada (sedimento) y la fracción citosólica (sobrenadante).

II-3 Valoración de la actividad de tirosina fosfatasas

Se valoró la actividad de fosfatasas utilizando pNPP como sustrato, en presencia de cantidades variables de ortovanadato. La actividad de pNPPasa fue medida en homogenatos derivados de ZF de adrenal, según la técnica descrita por Cirri y col. (Cirri y col., 1995). La mezcla de reacción (volumen final 1 ml) contenía: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2,34 mM pNPP, vanadato de sodio (concentraciones variables, 0-400 μ M) y un volumen apropiado de muestra (30-80 μ g de proteínas). Las reacciones de defosforilación se llevaron a cabo durante 30' a 30 °C y se detuvieron por agregado de 200 μ l de 1M NaOH. La actividad se determinó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 410 nm y calculando la concentración del ión p-nitrofenolato producido utilizando una absortividad molar de $1,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heinrikson, 1969).

II-4 Valoración de la actividad de serina/treonina fosfatasas

II-4.1 Marcación del sustrato

Se utilizó como sustrato histona fosforilada con ^{32}P . La reacción de marcación, realizada en un volumen de 400 μ l, incluyó 200 μ g de histona tipo III-S, solución amortiguadora de fosforilación (Tris 50 mM pH 6,5, Cl_2Mg 20 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM), subunidad catalítica de la PKA (4UI), 200 μ M de ATP, $[\text{}^{32}\text{P}] \gamma \text{ ATP}$ (actividad específica de la mezcla de reacción, 500 cpm/pmol). La

reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 15 minutos. Finalizada la incubación, la mezcla de reacción se sembró en una columna conteniendo Sephadex G50 (30 cm de largo x 0,7 cm de diámetro) equilibrada con Tris 10 mM pH 7,4. Se eluyó la columna con la solución de equilibrio y se recogieron alícuotas de 400 µl. Se contó la radioactividad emitida por efecto Cherenkov en cada fracción en un contador de centelleo líquido. Las alícuotas conteniendo la proteína marcada fueron seleccionadas para ser utilizadas en las reacciones de determinación de actividad de serina/treonina fosfatasas.

II-4.2 Obtención de las muestras a valorar

Se incubaron las células de Leydig, siguiendo un protocolo similar aldescripto más adelante para realizar los experimentos en los que se valora la producción de esteroides en presencia o ausencia de inhibidores de PPs, excepto que se omitió el agregado de BSA en el medio de incubación. Luego de incubar las células el tiempo correspondiente, se reunió la suspensión celular presente en varios tubos hasta reunir aproximadamente 5×10^6 células de Leydig.

Las células se separaron por centrifugación y se lavaron cuatro veces con solución fisiológica (0,9 % NaCl). Finalmente se resuspendieron en 400 µl de una solución conteniendo Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 50 mM (solución A) y se sonicaron (3 pulsos de 10 segundos, 50 W). Se valoró la cantidad de proteínas en el material sonicado y se ensayó la actividad con diferentes alícuotas de muestra para determinar la cantidad apropiada. Las diluciones de la muestra se realizaron en la misma solución A con el agregado de BSA 1 mg/ml y Cl_2Mn 12 mM (solución A⁺).

II-4.3 Determinación de la actividad

La solución conteniendo la histona fosforilada se diluyó hasta obtener aproximadamente 1.000.000 cpm/ml, en la solución A⁺. La reacción de desfosforilación incluyó 20 µl de histona marcada, 20 µl de muestra y 20 µl de

solución A⁺. La incubación se realizó a 30°C, durante 7 minutos. Al término de esta etapa se agregó 100 µl de BSA 3% y 100 µl de una solución de ácido tricloroacético 50 %. Las muestras se dejaron en hielo 10 minutos, luego se centrifugaron 5 minutos a 14.000 g y del sobrenadante se tomó una alícuota de 150 µl para contar radioactividad en un contador de centelleo líquido.

II-5 Western blot

Las proteínas de diferentes fracciones subcelulares (80 µg) fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE), según técnica descripta por Laemmli (Laemmli, 1970), y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa de acuerdo con el procedimiento descripto por Towbin y col. (Towbin y col., 1979). Las membranas se lavaron con TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM), se bloquearon en TTBS (TBS conteniendo 0.5 % Tween 20) y 1% seroalbúmina bovina (BSA) e incubaron durante una noche con el anticuerpo correspondiente en solución de bloqueo. Se lavaron las membranas cinco veces con TTBS, previo a la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con segundo anticuerpo, anti-IgG conjugado con peroxidasa. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia.

II-6 Preparación de células de ZF de adrenal e intersticiales de testículo

Se obtuvieron células de ZF de glándula adrenal y células intersticiales de testículo de rata por digestión con tripsina y collagenasa, respectivamente, siguiendo procedimientos publicados (Neher y Milani, 1978; Mendelson y col., 1975).

Las células de ZF se resuspendieron en solución amortiguadora Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,4, conteniendo 10 mM de glucosa y 0,5 % de BSA, en una concentración final de 10^5 células/ml.

Las células de Leydig se resuspendieron en Medio 199, 0,5 % BSA en una concentración final de 10^6 células/ml.

En ambos casos las células se mantuvieron constantemente bajo atmósfera de carbógeno. Rutinariamente, aproximadamente el 90 % de las células obtenidas se evaluaron viables por exclusión del colorante azul tripan (Phillips, 1973).

II-7 Incubación de células de ZF de adrenal e intersticiales de testículo.

Las células de ZF de glándula adrenal (10^5 células) se incubaron con ACTH, 8Br-AMPC o 22R-OH colesterol en concentraciones finales de 0,1 nM, 10 μ M y 5 μ M, respectivamente, en ausencia o presencia de los inhibidores permeables de fosfatasas de proteínas.

Las células de Leydig (10^6 células) se incubaron con 8 Br-AMPC o 22R-OH colesterol en concentraciones finales indicadas arriba, o con hCG en concentración final de 1 mUI, en ausencia o presencia de los inhibidores de fosfatasas.

Como inhibidores permeables de PTPs se utilizó óxido de fenilarsina, PAO (García Morales y col., 1990) y pervanadato, PV (Secrist y col., 1993).

Los compuestos que se usaron como inhibidores permeables de PPs fueron el ácido okadaico, OK y la caliculina A, CA. Ambos compuestos son inhibidores equipotentes de PP1 y PP2A (Cohen, 1989; Cohen y col., 1989).

Luego de los agregados apropiados, las células de ZF y de Leydig se incubaron durante 1,5 hs. a 37°C y durante 3 hs. a 35 °C respectivamente, bajo atmósfera de carbógeno y con agitación suave.

Las incubaciones se terminaron por enfriado de los tubos en baño agua/hielo y separando las células por centrifugación a 1000 x g durante 20 minutos (células ZF) o 10 minutos (células de Leydig). En los sobrenadantes de

las células respectivas se determinaron por radioinmunoensayo (RIA) los esteroides producidos.

En todos los casos, las incubaciones se realizaron en presencia de 0,1 mM de metilisobutilxantina (MIX), inhibidor de la fosfodiesterasa.

Los compuestos usados como inhibidores permeables de fosfatasa, no afectaron la viabilidad celular en las concentraciones utilizadas: PV, 2,5-10 μ M en células de ZF y 0,5-15 μ M en células de testículo; PAO, 0,5-2 nM en células de ZF y 0,5-2,5 mM en células de testículo; CA, 10 y 100 nM en células de ZF y 10-100 nM en células de testículo y OK, 1-100 nM en ambos tipos celulares. En todos los casos 85-90 % de las células se encontraron viables cuando se evaluó la exclusión del azul tripan luego de la incubación con los inhibidores (Phillips, H.J., 1973).

II-8 Análisis de inmunoprecipitación

Las proteínas del sobrenadante postmitocondrial se incubaron durante toda la noche a 4°C con 4 μ g de anticuerpo monoclonal IgG anti-paxilina y 20 μ l de Proteína A/G Agarosa Plus, en un volumen final de 0,5 ml de la siguiente solución amortiguadora (solución de inmunoprecipitación): 10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Tritón X-100, 0,5% Nonidet P40, 200 μ M de ortovanadato de sodio, 50 mM NaF, 1 mM PMSF y 10 μ M de leupeptina. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 12.000 g por 4 minutos. Los precipitados fueron lavados cuatro veces en 0,5 ml. de solución de inmunoprecipitación previo al hervido en solución de corrida con SDS. Las muestras fueron analizadas por Western-blot con anticuerpo anti-fosfotirosina.

II-9 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método descrito por Lowry y col. (Lowry y col., 1951), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

II-10 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm SEM. La significación estadística fue evaluada usando el test t de Student o ANOVA seguida por el test de Tukey, cuando correspondió; se consideró significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

I- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PTPs SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS

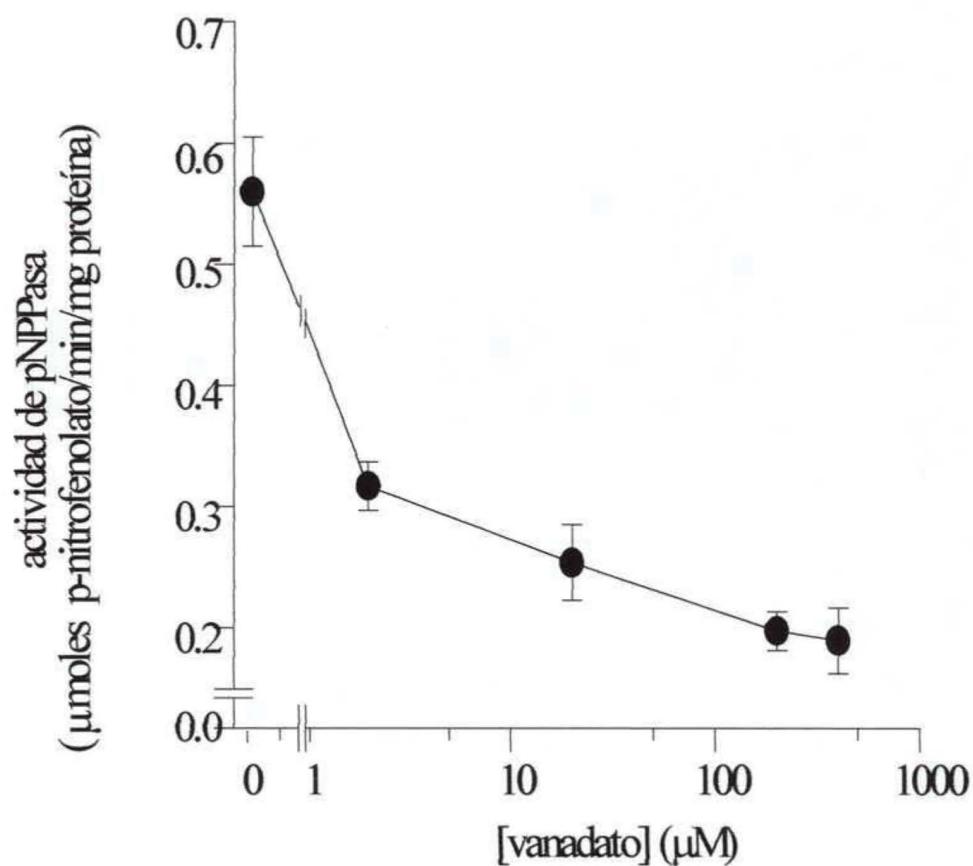
I-1 Inhibición de PTPs en células de ZF de corteza adrenal

Un objetivo de este trabajo era determinar la posible participación de la actividad de PTPs en los mecanismos de regulación hormonal de la esteroidogénesis en ZF de corteza adrenal de rata. Por lo tanto, primeramente investigamos la presencia de PTPs en este tejido evaluando tanto la actividad de las mismas como la presencia de algunos de los miembros más ubicuos de esta familia de proteínas

La actividad de PTPs se estimó teniendo en cuenta dos propiedades de estas enzimas: 1) las PTPs hidrolizan el p-nitrofenilfosfato, un sustrato universal de fosfatasas; 2) todas las PTPs se inhiben por ortovanadato en concentraciones entre 10 y 100 μM (Walton y Dixon, 1993). Se determinó así la actividad de pNPPasa en homogenato de ZF de adrenal de rata, en presencia de concentraciones variables de ortovanadato (0-400 μM). Como se observa en la Figura 6, el incremento en la concentración de ortovanadato redujo la actividad de pNPPasa, lo cual indica la presencia de tirosina fosfatasas en este tejido.

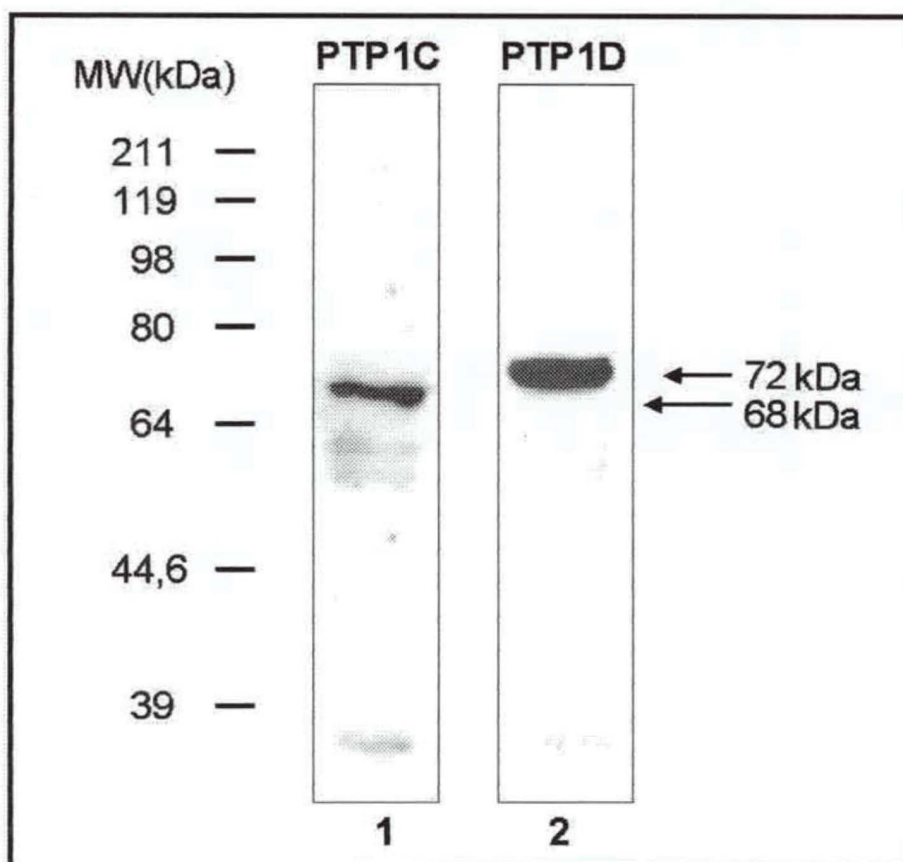
Si bien las PTPs están presentes en la mayoría de los tejidos de mamíferos, existen amplias variaciones cuali y cuantitativas de las PTPs que se expresan en cada tipo celular. Algunas de las PTPs que se expresan en casi todos los tejidos examinados son la PTP1C y PTP1D. Mediante experimentos de Western-blot utilizando anticuerpos específicos, pudimos comprobar que ambas enzimas se expresan en particular en ZF de corteza adrenal de rata, como se observa en la Figura 7.

FIGURA 6: Efecto del vanadato sobre la actividad de pNPPasa en homogenatos de ZF de adrenal de rata.



La actividad de pNPPasa fue medida en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de vanadato, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como media \pm SEM de determinaciones por cuadruplicado. Resultados similares fueron obtenidos en cuatro experimentos independientes.

FIGURA 7: Expresión de PTPs en ZF de adrenal de rata.



Se obtuvo ZF de adrenal de rata (control) y luego de homogeneizar el tejido y de realizar el fraccionamiento subcelular, se analizó en la fracción citosólica por Western blot la expresión de las PTPs más ubicuas, PTP1C (carril 1) y PTP1D (carril 2). La señal obtenida en cada caso corresponde a proteínas de peso molecular 68 y 72 kDa respectivamente, coincidente con el peso molecular descripto para cada una de ellas en otras especies.

Luego de comprobar que en ZF se detecta tanto la presencia de PTPs como la correspondiente actividad, iniciamos los estudios tendientes a determinar el rol de esta actividad en la regulación hormonal de la esteroidogénesis. La estrategia seguida fue cuantificar los esteroides producidos por la ZF en ausencia y presencia de inhibidores permeables de las PTPs y de ACTH u 8Br-AMPc.

Los dos inhibidores de PTPs que se utilizaron fueron pervanadato (PV), generado por oxidación del vanadato de sodio con H_2O_2 , y el óxido de fenilarsina (PAO). Ambos inhibidores son potentes agentes oxidantes, capaces de modificar el grupo sulfhidrilo de la cisteína presente en el sitio activo de la enzima e indispensable para la actividad catalítica (Walton y Dixon, 1993).

Los efectos del pervanadato sobre la producción de corticosterona basal y estimulada por ACTH y 8Br-AMPc se muestran en la Figura. 8. El pervanadato, en concentraciones comprendidas entre 2,5 y 10 μM , causó una inhibición concentración-dependiente de la producción de corticosterona estimulada por ACTH. En el mismo rango de concentraciones el pervanadato también inhibió de un modo similar la producción de esteroides estimulada por 8Br-AMPc sin afectar la producción basal.

Con el objeto de confirmar que los efectos observados son debidos al pervanadato generado en estas condiciones y no a los reactivos utilizados para su generación, se incubaron las células con una solución conteniendo H_2O_2 y catalasa, preparada y diluida en las mismas condiciones que las utilizadas en la preparación del pervanadato pero en ausencia de vanadato. Los resultados mostraron que estos reactivos no inhiben la síntesis de esteroides producida basalmente ni la estimulada por ACTH u 8Br-AMPc (datos no mostrados). Se deduce así que los resultados observados son debidos al pervanadato generado.

Se ha descrito en la bibliografía que el pervanadato puede tener efectos estimulatorios sobre la actividad de tirosina quinasas (Fantus y col., 1989; Secrist y col., 1993), razón por la cual podría argumentarse que los efectos del pervanadato sobre la esteroidogénesis sean mediados por este mecanismo. Teniendo en cuenta que el óxido de fenilarsina es otro potente inhibidor de las PTPs y éste no afecta la actividad de tirosina quinasas, se analizó el efecto de

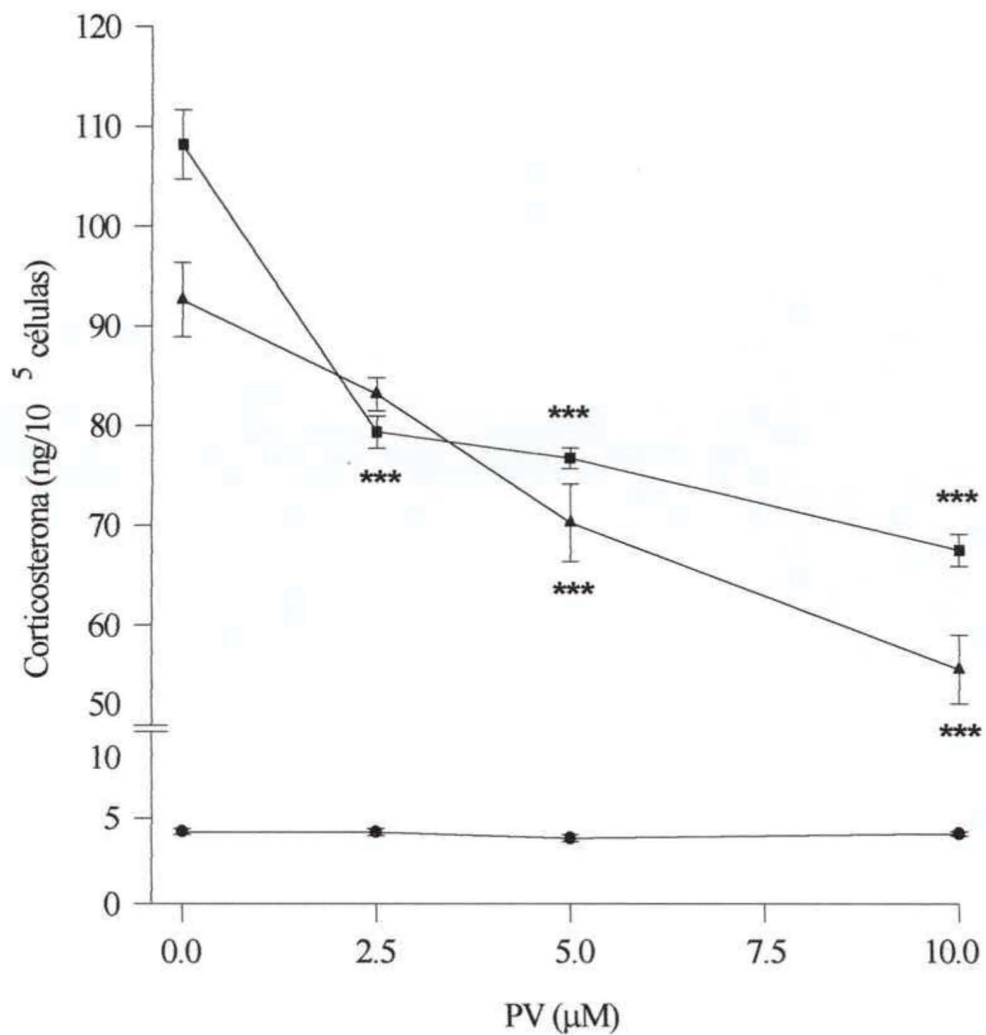
este inhibidor sobre la esteroidogénesis para confirmar la acción de PTPs en la regulación de este proceso.

En la Figura 9 se muestran los efectos del óxido de fenilarsina sobre la producción de corticosterona basal y estimulada por ACTH y 8Br-AMPc. Este compuesto, en concentraciones comprendidas entre 0,5 y 2 nM, sin alterar la esteroidogénesis basal, causó una inhibición dosis-dependiente de la producción de corticosterona estimulada por ACTH. La máxima concentración utilizada (2 nM) inhibió la acción de ACTH en aproximadamente un 40 %. Resultados similares se obtuvieron al evaluar la producción de esteroides estimulada por 8Br-AMPc en presencia del inhibidor.

Con el objetivo de establecer el sitio de acción de las PTPs, se estudió el efecto de los inhibidores sobre la síntesis de esteroides sostenida a partir de un análogo del colesterol. Para realizar estos estudios se empleó 22R-OH-colesterol, compuesto que tiene libre acceso al citocromo P450_{SCC} por no requerir mecanismos de transporte a través de la membrana mitocondrial. El tratamiento con óxido de fenilarsina y con pervanadato, en las concentraciones utilizadas en los ensayos anteriormente descritos, no afectó la síntesis de esteroides a partir de 22R-OH-colesterol (Tabla 1). Estos resultados excluyen cualquier efecto de los inhibidores de PTPs sobre las enzimas mitocondriales que participan en la conversión de colesterol a corticosterona y muestran, junto con la determinación de viabilidad celular al término de las incubaciones (ver Materiales y Métodos), que los inhibidores no tienen otros efectos celulares tóxicos. Además, sumado a los obtenidos al estudiar los efectos de los inhibidores sobre la esteroidogénesis estimulada por 8Br-AMPc, sugiere que el sitio de acción de las PTPs se encuentra luego de la acción del AMPc y antes del transporte del colesterol a la mitocondria.

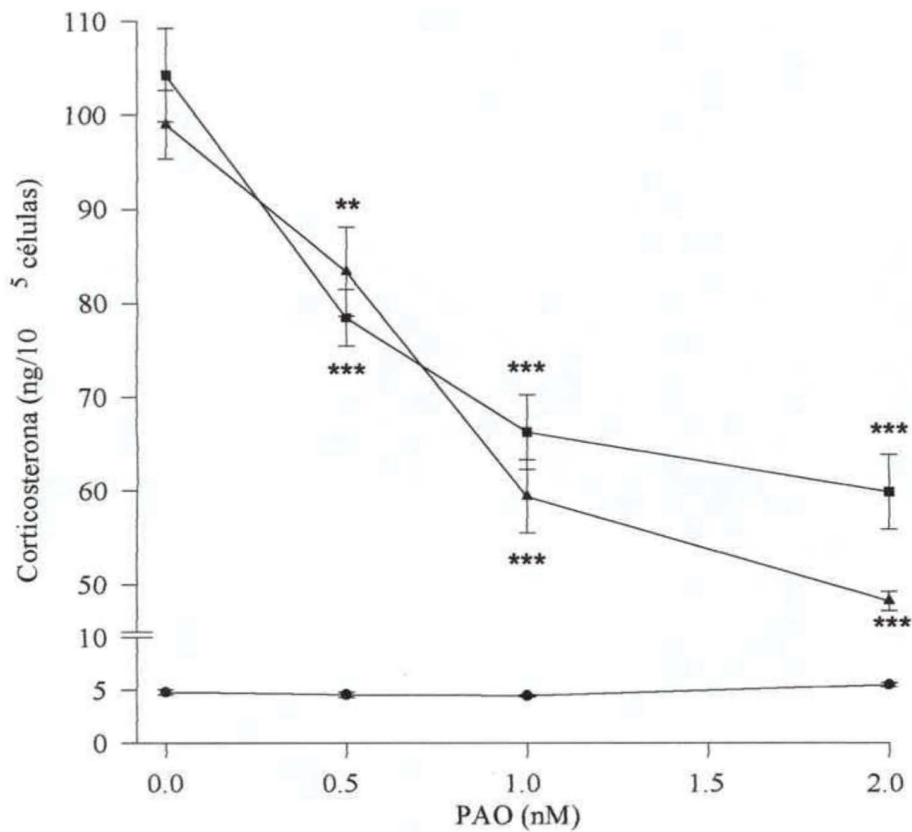
Dado que los dos inhibidores de PTPs reducen la producción de esteroides estimulada por ACTH u 8Br-AMPc sin alterar la viabilidad celular ni la actividad de las enzimas esteroidogénicas se concluye que las PTPs participan en el mecanismo por el cual la hormona estimula la esteroidogénesis.

FIGURA 8: Efecto del PV sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH y 8Br-AMPc por células de ZF de adrenal de rata.



Las células de ZF de adrenal fueron incubadas con o sin ACTH (0,1 nM) u 8Br-AMPc (10 μM) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de PV. La producción de corticosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$ vs. ACTH u 8Br-AMPc, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●---●, ACTH: ■---■, 8Br-AMPc: ▲---▲).

FIGURA 9: Efecto del PAO sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH y 8Br-AMPc por células de ZF de adrenal de rata.



Las células de ZF de adrenal fueron incubadas con o sin ACTH (0,1 nM) u 8Br-AMPc (10 μ M) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de PAO. La producción de corticosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$ y ** $P < 0,01$ vs. ACTH u 8Br-AMPc, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●---●, ACTH: ■---■, 8Br-AMPc: ▲---▲).

TABLA 1: Efecto de los inhibidores de PTPs en la esteroidogénesis a partir de 22R-OHcolesterol

CÉLULAS DE ZONA FASCICULATA DE ADRENAL	
TRATAMIENTO	CORTICOSTERONA (ng/10⁵ células)
22R-OHcolesterol	96,0 ± 1,9
22R-OHcolesterol + PV 10 µM	99,1 ± 2,6
22R-OHcolesterol + PAO 2 nM	92,0 ± 2,5

Las células fueron incubadas con 5 µM de 22R-OHcolesterol en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de ambos inhibidores. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media ± SEM de cuatro determinaciones independientes. No hubo diferencia significativa entre 22R-OHcolesterol solo y en presencia de concentraciones máximas de cada inhibidor de PTPs testeado, test t de Student.

I-2 Inhibición de PTPs en células intersticiales de testículo

En células de Leydig, la regulación de la producción de esteroides por LH involucra un mecanismo de acción similar al de ACTH en ZF. En ambos casos la respuesta celular depende de la fosforilación de proteínas regulatorias por la PKA. Los resultados que nos demostraron la participación de las PTPs en la regulación de la esteroidogénesis por ACTH nos indujeron a analizar si el mismo evento ocurre en el mecanismo de acción de LH/CG. Nuevamente se usaron los inhibidores de PTPs mencionados para analizar esta hipótesis.

Los efectos del PV sobre la producción de testosterona por células de Leydig de rata, tanto basal como estimulada por hCG y 8Br-AMPC, se muestran en

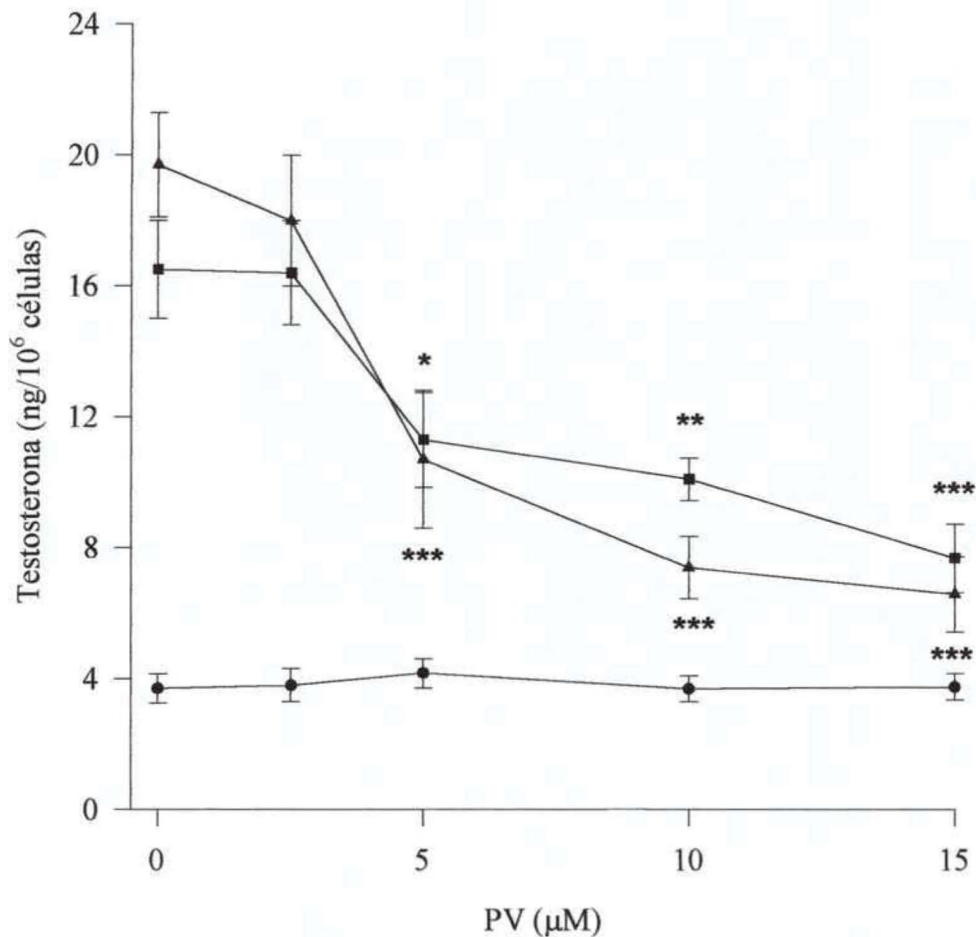
la Figura 10. Nuevamente este inhibidor, sin modificar la esteroidogénesis basal, bloqueó la respuesta al estímulo hormonal y al 8Br-AMPC, en un rango de concentración del mismo orden que el utilizado en el sistema adrenal/ACTH.

El efecto del PAO fue asimismo estudiado en células de Leydig. La producción de testosterona estimulada tanto por hCG como por 8Br-AMPC, en presencia de concentraciones variables de PAO también resultaron significativamente menores que la observada en ausencia del inhibidor (Figura 11). En ambos casos el grado de inhibición fue dependiente de la concentración, obteniéndose 100 % de inhibición a partir de 1 μ M del inhibidor. Una vez más la esteroidogénesis basal no resultó afectada por el PAO.

Como se observó en ZF, ninguno de los inhibidores modificó la síntesis de esteroides sostenida a partir del 22R-OH colesterol, como se muestra en la Tabla 2.

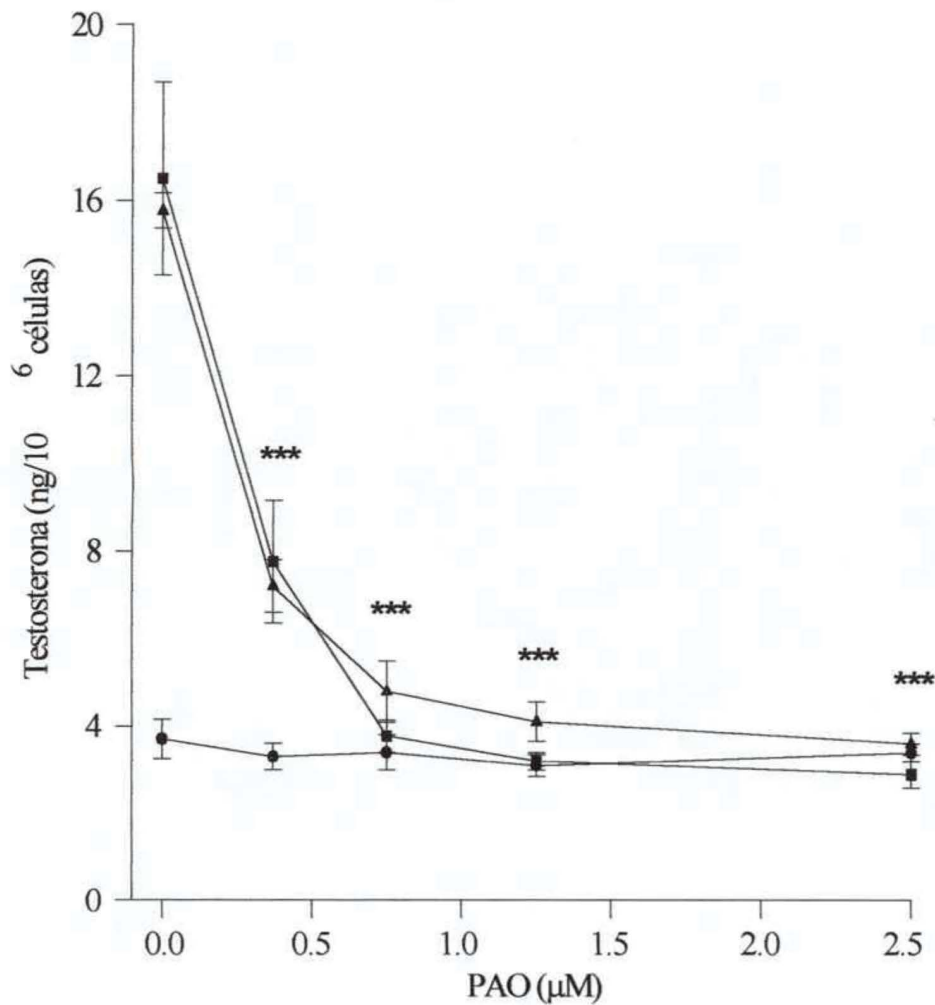
Teniendo en cuenta que los inhibidores de PTPs causan el mismo efecto sobre la producción de esteroides regulada hormonalmente en los dos sistemas esteroidogénicos, se sugiere que la desfosforilación en residuos de tirosina es un evento crucial y posiblemente universal en la regulación de la esteroidogénesis.

FIGURA 10: Efecto del PV sobre la producción de testosterona estimulada por hCG y 8Br-AMPC por células intersticiales de testículo de rata.



Las células intersticiales de testículo fueron incubadas con o sin hCG (1 mUI) u 8Br-AMPC (10 μM) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de PV. La producción de testosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ vs. hCG u 8Br-AMPC, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●---●, hCG: ■---■, 8Br-AMPC: ▲---▲).

FIGURA 11: Efecto del PAO sobre la producción de testosterona estimulada por hCG y 8Br-AMPC por células intersticiales de testículo de rata.



Las células intersticiales de testículo fueron incubadas con o sin hCG (1 mUI) u 8Br-AMPC (10 μM) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de PAO. La producción de testosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$ vs. hCG u 8Br-AMPC, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●---●, hCG: ■---■, 8Br-AMPC: ▲---▲).

TABLA 2: Efecto de los inhibidores de PTPs en la esteroidogénesis a partir de 22R-OHcolesterol

CÉLULAS INTERSTICIALES DE TESTÍCULO	
TRATAMIENTO	TESTOSTERONA (ng/10⁶ células)
22R-OHcolesterol	38,3 ± 4,4
22R-OHcolesterol + PV 10 µM	33,8 ± 3,0
22R-OHcolesterol + PAO 2 nM	41,3 ± 1,2

Las células fueron incubadas con 5 µM de 22R-OHcolesterol en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de ambos inhibidores. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media ± SEM de cuatro determinaciones independientes. No hubo diferencia significativa entre 22R-OHcolesterol solo y en presencia de concentraciones máximas de cada inhibidor de PTPs testeado, test t de Student.

II- ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA DE ZF DE ADRENAL DE RATA

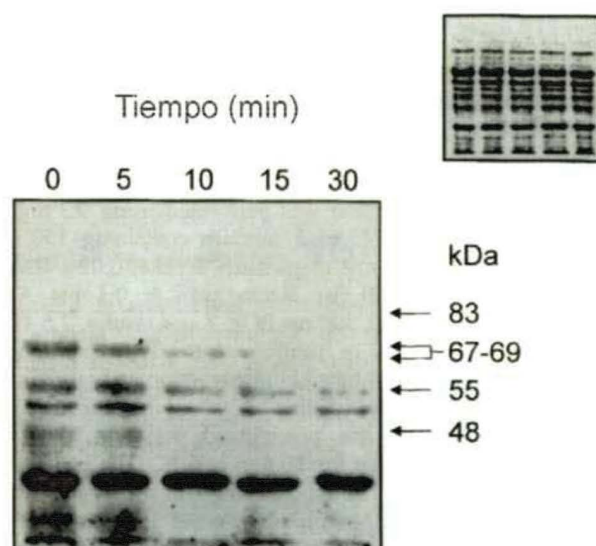
II-1 Análisis por Western-blot

Al observar que la síntesis de esteroides en ZF depende de la actividad de PTPs nos planteamos si esta actividad se halla bajo control de ACTH. Con el fin de confirmar esta hipótesis se procedió a analizar el contenido de fosfotirosina en proteínas endógenas de ZF de ratas sacrificadas a distintos tiempos luego de la administración de una dosis de ACTH. Al analizar las proteínas de diferentes compartimentos subcelulares por Western-blot con anticuerpos anti-fosfotirosina se comprobó que el tratamiento de los animales con ACTH por diferentes tiempos causó la desfosforilación dependiente del tiempo de proteínas tanto de la fracción citosólica (Figura 12, panel principal) como de la fracción microsomal (Figura 13). Conforme se incrementa el tiempo de estimulación, las proteínas solubles de 83, 67-69, 55 y 48 kDa disminuyen la intensidad de la señal correspondiente a P-tirosina. En algunos casos, como ocurre con la proteína de 83 kDa, este efecto se detecta al menor tiempo ensayado (5 minutos) y progresa de manera tal que a los 10 minutos de tratamiento la señal de fosfotirosina no se detecta (Fig. 12). Dado que la cantidad de proteínas transferidas en todos los carriles es idéntica, de acuerdo a la tinción con Ponceau (Fig. 12, panel superior), se deduce que la disminución en la intensidad de las señales es debida a la desfosforilación en tirosina de las proteínas.

Asimismo, al analizar las proteínas de la fracción particulada, se detectó que el contenido en fosfotirosina de una proteína de 120 kDa disminuye por tratamiento de los animales con ACTH. En este caso la señal desaparece por completo luego de 15 minutos de estimulación.

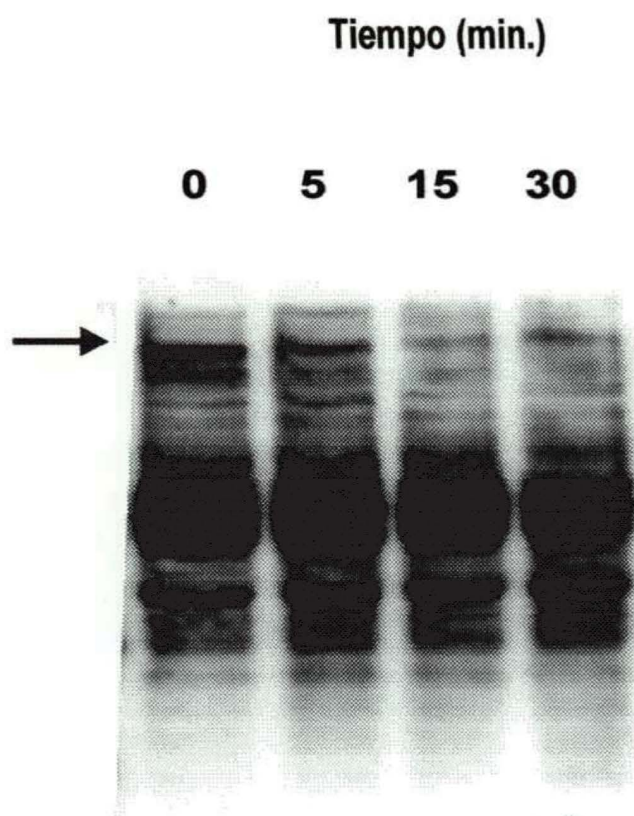
Paralelamente al desarrollo de estos experimentos en el laboratorio se realizó la determinación de la actividad *in vitro* de las PTPs utilizando un sustrato exógeno. Estos estudios permitieron demostrar, por primera vez, que ACTH

FIGURA 12: Efecto del tiempo de estimulación con ACTH sobre el contenido de fosfotirosina de proteínas citosólicas de ZFde adrenal de rata



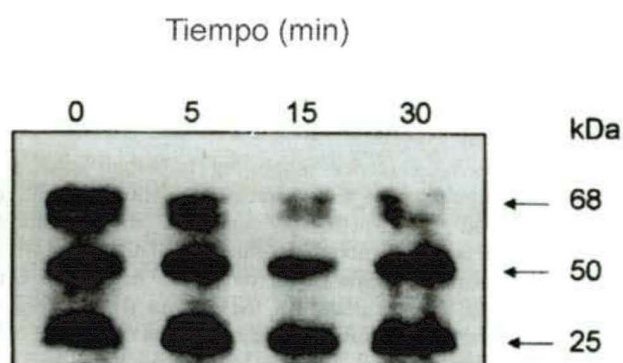
Luego de la administración de ACTH se sacrificaron los animales a los tiempos indicados y se procesaron las adrenales para obtener la fracción citosólica. Cantidades iguales de proteína (80 μ g) de esta fracción se analizaron por Western-blot con anticuerpos anti-fosfotirosina. Se observa que conforme progresa el tiempo de estimulación, las proteínas cuyo peso molecular se indica a la derecha de la figura (panel principal) disminuyen su contenido en fosfotirosina. El panel superior muestra la tinción con Ponceau de la membrana e indica igual cantidad de proteína transferida en todos los carriles.

FIGURA 13: Efecto del tiempo de estimulación sobre el contenido de fosfotirosina de proteínas microsomales de ZF de adrenal de rata.



Luego de la administración de ACTH se sacrificaron los animales a los tiempos indicados y se procesaron las adrenales para obtener la fracción microsomal. Cantidades iguales de proteína (80 μ g) de esta fracción se analizaron por Western-blot con anticuerpos anti-fosfotirosina. Se observa que conforme progresa el tiempo de estimulación, una proteína de 120 kDa disminuye su contenido en fosfotirosina.

FIGURA 14: Efecto del tiempo de estimulación con ACTH sobre el contenido de fosfotirosina de la paxilina



Luego de la administración de ACTH se sacrificaron los animales a los tiempos indicados y la ZF de corteza adrenal se homogeneizó y se sometió a fraccionamiento subcelular. Las proteínas del sobrenadante postmitocondrial (400-500 μ g) se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-paxilina y el inmunoprecipitado se analizó por Western-blot con anticuerpos anti-fosfotirosina. Se indican con los números a la derecha los pesos moleculares de la paxilina (68 kDa), de la cadena pesada (50 kDa) y liviana (25 kDa) de la IgG.

produce un incremento rápido y transiente de la actividad de PTPs de la fracción soluble. El mismo efecto se observó cuando se realizó la determinación en muestras obtenidas de adrenales estimuladas *in vitro* con ACTH o con 8Br-AMPC. Estos resultados, sumados a los que muestran que ACTH promueve la desfosforilación de proteínas endógenas, permiten confirmar la existencia de PTPs reguladas por acción de ACTH.

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, el mecanismo de transducción de señales que desencadena ACTH involucra la activación de PKA y la fosforilación de proteínas regulatorias. Los resultados que demuestran estimulación de PTPs por mecanismos dependientes de ACTH y de AMPc sugieren que la regulación se ejerce mediante eventos de fosforilación de proteínas dependientes de la PKA.

II-2 Identificación de un sustrato endógeno de PTPs desfosforilado por acción de ACTH

Al comprobar que ACTH promueve la desfosforilación endógena de proteínas en residuos de tirosina resulta importante identificar estas fosfoproteínas con el fin de determinar luego cuál es la función de las mismas en la regulación de la esteroidogénesis por ACTH.

Hemos mencionado que los componentes del citoesqueleto participan, aunque no siempre de la misma manera, en la esteroidogénesis. Por otra parte hemos mencionado estudios que describen la desfosforilación en residuos de tirosina de la paxilina, una proteína del citoesqueleto, por acción de ACTH. Estas consideraciones, sumado a que en nuestros experimentos detectamos la desfosforilación de una proteína de peso molecular similar que ésta (67-69 kDa), nos llevó a analizar si en ZF de adrenal de rata, ACTH modifica el contenido de fosfotirosina de la paxilina. Como se observa en la Figura 14, el análisis del inmunoprecipitado muestra que la paxilina de ZF reduce su contenido en fosfotirosina conforme aumenta el tiempo de estimulación con ACTH.

III- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PPs SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS

III-1 Inhibición de PPs en células de ZF de corteza adrenal

Sayed y col. han demostrado, en células de ZF de corteza adrenal de rata, que los inhibidores de PPs, caliculina A (CA) y ácido okadaico (OK) provocan una disminución de la síntesis de corticosterona estimulada por hormona y por análogos permeables del AMPc, sin modificar la producción basal ni la sostenida a partir del 22R-OHcolesterol. Sin embargo, en otros tipos celulares, otros autores han obtenido resultados distintos a los de Sayed y col. Nuestro objetivo fue extender el estudio de los inhibidores de PPs sobre la regulación hormonal de la esteroidogénesis en otro sistema, tal como la célula de Leydig. Entonces, primeramente evaluamos el efecto de dichos inhibidores en ZF de corteza adrenal, un sistema donde este estudio ya fue realizado.

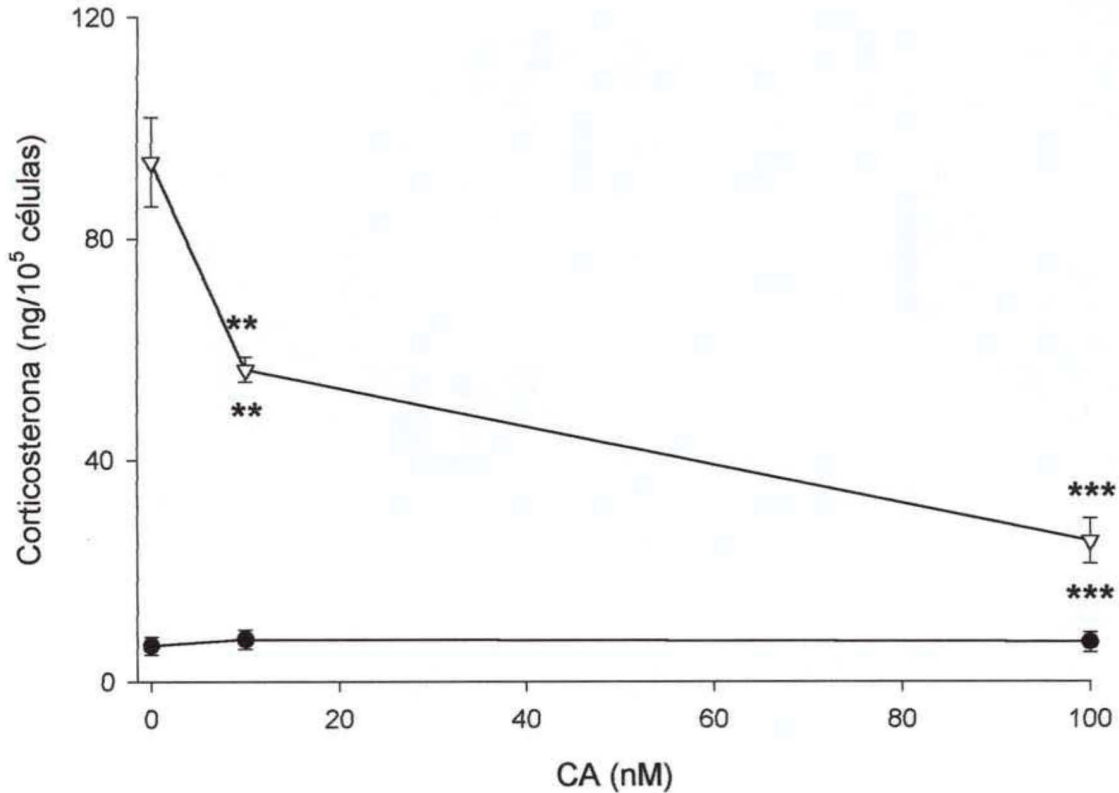
El protocolo de trabajo incluyó la utilización de los inhibidores permeables y específicos de estas enzimas, CA y OK, cada uno de los cuales inhibe con igual potencia a las mismas.

Como se observa en la Figura 15, la CA inhibió la síntesis de esteroides estimulada por ACTH sin modificar la esteroidogénesis basal. La mínima concentración de CA utilizada (10 nM) fue suficiente para reducir significativamente la producción de esteroides. Una concentración de 100 nM de este inhibidor causó una disminución del 75 % aproximadamente. En la Tabla 3 se ilustra que la máxima concentración de CA no inhibió la esteroidogénesis mantenida a partir del 22R-OHcolesterol. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sayed y col.

A diferencia de los resultados obtenidos con CA, la esteroidogénesis (basal o estimulada por ACTH) no se modificó por la presencia de OK en el medio de incubación (Tabla 4). En este aspecto nuestros resultados difieren de los presentados por Sayed y col., ya que ellos observan que una concentración de 100 nM de OK reduce la esteroidogénesis estimulada por ACTH. Sin embargo, este efecto es menos pronunciado que el observado con CA, ya que 100 nM de CA

disminuye la producción de corticosterona a valores basales mientras que la misma concentración de OK no logra el mismo efecto (Sayed y col., 1997).

FIGURA 15: Efecto de la CA sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en células de ZF de corteza adrenal de rata.



Las células de ZF de adrenal fueron incubadas con o sin ACTH en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de CA. La producción de corticosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$ y ** $P < 0,01$ vs. ACTH, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●---●, ACTH: ▽---▽).

TABLA 3: Efecto de la CA en la esteroidogénesis a partir de 22R-OHcolesterol.

CÉLULAS DE ZONA FASCICULATA DE ADRENAL	
TRATAMIENTO	CORTICOSTERONA (ng/10⁵ células)
22R-OHcolesterol	85,0 ± 4,1
22R-OHcolesterol + CA 100 nM	91,0 ± 3,0

Las células fueron incubadas con 5 μ M de 22R-OHcolesterol en ausencia o presencia de la concentración indicada del inhibidor. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. No hubo diferencia significativa entre 22R-OHcolesterol solo y en presencia de CA, test t de Student.

TABLA 4: Efecto del OK sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en células de ZF de corteza adrenal de rata

TRATAMIENTO	CORTICOSTERONA (ng/10 ⁵ células)
Control	5,5 ± 0,9
Control + OK 100 nM	6,1 ± 1,2
ACTH	93,0 ± 6,0
ACTH + OK 100 nM	82,0 ± 4,2

Las células fueron incubadas con 0,1 nM de ACTH en ausencia o presencia de la concentración indicada de OK. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media ± SEM de cuatro determinaciones independientes. La máxima concentración de OK no modificó significativamente la esteroidogénesis basal ni estimulada por ACTH, ANOVA.

III-2 Inhibición de PPs en células intersticiales de testículo

Como se mencionó en la introducción de este trabajo y en el ítem anterior, los resultados obtenidos al estudiar los efectos de la actividad de PP1/PP2A sobre la esteroidogénesis no siempre son coincidentes. Incluso en estos estudios no se ha incluido a las células de Leydig como sistema productor de esteroides. Con estos antecedentes nos fijamos como siguiente objetivo de trabajo analizar si la producción de esteroides estimulada por hCG en células de Leydig es modulada por la actividad de PP1/PP2A. El protocolo incluyó nuevamente la utilización de CA y OK.

Primeramente confirmamos la efectividad de estos compuestos para inhibir *in vivo* la actividad de PPs en este sistema, para lo cual se valoró la actividad en

extractos de células incubadas durante dos horas con los inhibidores y utilizando como sustrato histona fosforilada en residuos de serina/treonina con ^{32}P (ver Materiales y Métodos). Las determinaciones indicaron que en las células incubadas con estos inhibidores (100 nM en ambos casos) la actividad de PP1/PP2A se reduce un 90-95% (OK y CA respectivamente) aproximadamente respecto a la detectada en células incubadas en ausencia de los mismos. Por las condiciones en las que se realiza el ensayo (ausencia de Ca^{++} y de Mg^{++}) la actividad valorada corresponde específicamente a PP1/PP2A, lo cual no sólo indica que en las células intersticiales de testículo estas enzimas están presentes sino también que son inhibidas *in vivo* por estos compuestos. Incluso hemos detectado su presencia en células de Leydig MA-10 mediante Western-blot con anticuerpos específicos (datos no mostrados).

Al estudiar los efectos del OK sobre la esteroidogénesis en células intersticiales en condiciones basales y bajo el estímulo de hCG, comprobamos que este inhibidor, en el rango de concentraciones empleadas (1-100 nM) no modifica la esteroidogénesis estimulada hormonalmente ni la producida en condiciones basales (Tabla 5).

Contrariamente a los resultados obtenidos con el OK, cuando analizamos los efectos de la CA en el mismo rango de concentraciones observamos que este compuesto inhibe de manera dosis dependiente la esteroidogénesis estimulada por hCG. El efecto es significativo a partir de 10 nM de CA y lleva la producción de esteroides a los niveles basales con 100 nM del inhibidor (Figura 16). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la respuesta al 8 Br-AMPC, (Fig. 16) lo cual indica que los efectos de la CA sobre la respuesta hormonal se deben a una acción localizada luego de la formación del segundo mensajero. Por otra parte la CA no modificó la producción de esteroides sostenida a partir de 22R-OHcolesterol (Tabla 6), lo cual indica que el sistema enzimático mitocondrial no está afectado y además no alteró la viabilidad celular.

TABLA 5: Efecto del OK sobre la producción de testosterona estimulada por hCG en células intersticiales de testículo

TRATAMIENTO	TESTOSTERONA (ng/10 ⁶ células)
Control	4,7 ± 0,7
Control + OK 100 nM	4,6 ± 0,5
hCG	14,0 ± 3,0
hCG + OK 100 nM	12,5 ± 2,3

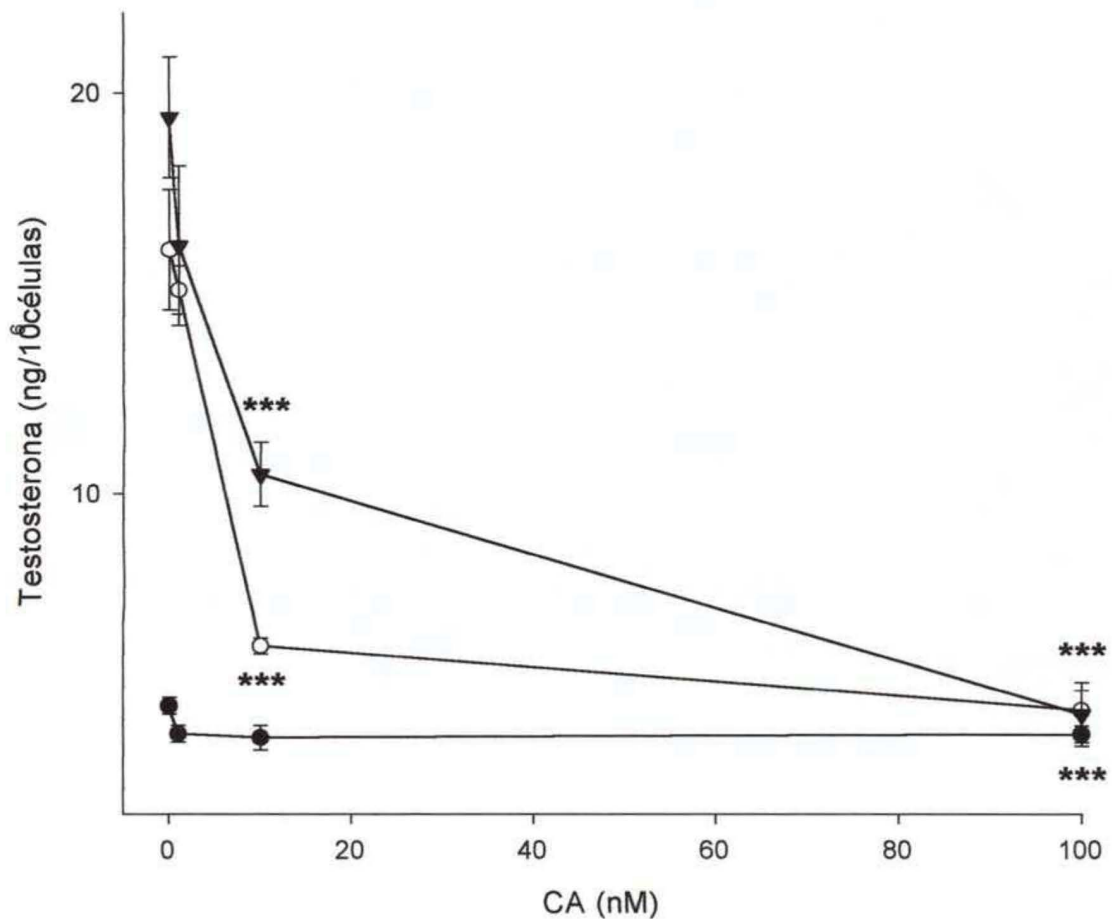
Las células fueron incubadas con 1 mUI de hCG en ausencia o presencia de la concentración indicada de OK. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media ± SEM de cuatro determinaciones independientes. La máxima concentración de OK no modificó significativamente la esteroidogénesis basal ni estimulada por hCG, ANOVA.

TABLA 6: Efecto de la CA en la esteroidogénesis a partir de 22R-OHcolesterol.

CÉLULAS INTERSTICIALES DE TESTÍCULO	
TRATAMIENTO	TESTOSTERONA (ng/10⁶ células)
22R-OHcolesterol	35,1 ± 2,7
22R-OHcolesterol + CA 100 nM	36,0 ± 2,0

Las células fueron incubadas con 5 μ M de 22R-OHcolesterol en ausencia o presencia de la concentración indicada de CA. Los esteroides producidos, medidos por RIA en el medio de incubación, están expresados como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. No hubo diferencia significativa entre 22R-OHcolesterol solo y en presencia de la concentración máxima de CA, test t de Student.

FIGURA 16: Efectos de la CA sobre la producción de testosterona estimulada por hCG y 8Br-AMPC por células intersticiales de testículo de rata.



Las células intersticiales de testículo fueron incubadas con o sin hCG (1 mUI) u 8Br-AMPC (10 μ M) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de CA. La producción de testosterona fue determinada por RIA en el medio de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM de cuatro determinaciones independientes. *** $P < 0,001$ vs. hCG u 8Br-AMPC, ANOVA, seguido de test de Tukey. (control: ●—●, hCG: ○—○, 8Br-AMPC: ▼—▼).

CONCLUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado la participación de las serina/treonina y de las tirosina fosfatasas en el mecanismo de acción de ACTH y LH sobre la producción de esteroides en células de ZF de corteza adrenal y en células de Leydig, respectivamente.

En células de Leydig, un sistema en el cual no se había descripto la acción de un inhibidor de PPs como la caliculina A (CA), observamos que dicho inhibidor en una concentración 100 nM produce un bloqueo total de la síntesis de esteroides estimulada por LH/CG. En contraste, el ácido okadaico (OK) (100 nM), otro inhibidor de PPs, no afectó la esteroidogénesis.

Resultados similares observamos al evaluar la esteroidogénesis estimulada por ACTH en células de ZF en presencia y ausencia de estos inhibidores. En este sistema nuestros resultados difieren parcialmente con los mostrados por Sayed y col. (Sayed y col., 1997), ya que estos autores observaron que el OK produce una disminución significativa de la esteroidogénesis estimulada por ACTH en tanto que en nuestros experimentos no detectamos la inhibición. Sin embargo, el grado de inhibición que Sayed y col. observan con OK no es tan marcado como el que registran con CA, a pesar de que *in vivo* ambos inhibidores disminuyen la actividad de PPs.

Aún cuando la CA produjo una inhibición significativa de la esteroidogénesis estimulada por la hormona o por un análogo permeable del AMPc no se puede aseverar que las PPs estén involucradas en el mecanismo de acción de las hormonas ACTH y LH/CG. Más aún cuando comprobamos que los dos inhibidores que provocan el mismo grado de inhibición en ensayos *in vivo* de la actividad de PPs no producen el mismo efecto sobre la esteroidogénesis.

Las discrepancias observadas pueden obedecer al hecho que la CA inhiba la esteroidogénesis por un efecto inespecífico más que a una acción sobre las PPs o al hecho que los dos inhibidores tengan distinta accesibilidad a los diferentes compartimientos subcelulares. En este último caso, sólo el inhibidor más permeable tendrá acceso al compartimiento donde se localizan las PPs que

intervienen hipotéticamente en la esteroidogénesis.

Otro mecanismo estudiado, como señalamos anteriormente, fue la participación de las PTPs. En este trabajo hemos demostrado que la inhibición de las PTPs, tanto por pervanadato (PV) como por óxido de fenilarsina (PAO), produce un bloqueo de la producción de esteroides estimulada por hormona, tanto en células de ZF como en células de Leydig. El mismo efecto fue evidenciado al evaluar la esteroidogénesis estimulada por un análogo permeable del AMPc, mientras que la esteroidogénesis sostenida a partir de un análogo permeable del colesterol (que accede libremente al P-450_{scc}), no se modifica por la presencia de inhibidores de PTPs en el medio de incubación. Estos resultados sugieren que la actividad de PTPs juega un rol crítico en la regulación hormonal de la esteroidogénesis actuando en un punto situado entre la activación de la PKA y el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna.

Comprobamos que en ZF, ACTH desencadena la desfosforilación en tirosina de proteína endógenas, entre ellas una proteína del citoesqueleto, la paxilina. Estos resultados nos sugieren que este proceso puede ser mediado por la participación de PTPs reguladas por ACTH. Trabajos realizados en este laboratorio, en paralelo al desarrollo del que aquí presentamos, nos han permitido comprobar, por primera vez, que efectivamente ACTH desencadena un incremento rápido y transiente de la actividad de PTPs.

En base al conjunto de resultados presentados la hipótesis que planteamos es que una o más proteínas fosforiladas en tirosina ejercen un control negativo sobre la esteroidogénesis. La activación de PTPs específicas dependientes de ACTH y de AMPc provocaría la desfosforilación en tirosina de las mismas para permitir que la hormona ejerza su efecto estimulatorio máximo sobre la síntesis de esteroides.

BIBLIOGRAFÍA

- Abayasekara, D.R.E., Ford, S.L., Persaud, S.J. y Jones, P.M. (1996) *J. Mol. Endocrinol.* **150**: 213-221.
- Aharoni, D., Dantes, A., y Amsterdam, A. (1993) *Endocrinology* **133**: 1426-1436.
- Almahbobi, G., Williams, L.J., Han, X.G. y Hall, P.F. (1993) *J.Reprod. Fertil.* **98** (1): 209-217.
- Azhar, S., Wang, H., Tsai, L., y Reaven, E., (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179** (2): 726-733.
- Bandyopadhyay, D., Kusari, A., Kenners, K.A., Liu, F., Chernoff, J., Gustafson, T.A. y Kusari, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (3):1639-1645.
- Barnes, G.N., Slevin, J.T. y Vanaman, T.C. (1995) *J. Neurochem.* **64**: 340-353.
- Begum, N. y Ragolia, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** (49): 31166-31177.
- Bilwes, A.M., Den Hertog, J., Hunter, T. y Noel, J.P. (1996) *Nature* **382**: 555-559.
- Brautigan, D.L. y Pinault, F.M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (15): 6696-6700.
- Brumell, J., Chan, C., Butler, J., Borregaard, N., Siminovitch, K., Grinstein, S. y Downey, G.P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (2): 875-882.
- Celis, M.E. y Scimonelli, T.N. (1984) *Neuroendocrinología Latinoamericana* **1**: 45-54.
- Cirri, P., Caselli, A., Manao, G., Camici, G., Polidori, R., Cappugi, G. y Ramponi, G. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1243**:129-135.
- Chen, J., Martin, B.L. y Brautigan D.L. (1992) *Science* **257**: 1261-1264.
- Chen, J., Parsons, S. y Brautigan, D.L. (1994) *J. Biol. Chem.* **268**: 7957-7962.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R. y Stocco, D.M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269** (1): 28314-28322.
- Cohen, P., Rylatt, D.B. y Nimmo, G.A. (1977) *FEBS Lett.* **76**, 182.
- Cohen, P., Nimmo, G.A., Shenolikar, S. y Foulkes, J.G. (1978) *FEBS Symp.* **54**, 161.
- Cooke, B.A., Lindh, M.L. y Janszen, F.H.A. (1976) *Biochem. J.* **160**:439-446.

- Crivello, J.C.F. y Jefcoate, C.R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**:8144-8151.
- Charbonneau, H. y Tonks, N. (1992) *Ann. Rev. Biochem.* **8**:463-493.
- Daum, G., Zander, N.F., Morse, B., Hurwitz y D., Schlessinger, (1991) *J. J.Biol. Chem.* **266**: 12211-12215.
- Davis, W.W. y Garren, L.D. (1968) *J. Biol. Chem.* **234**: 5153-5157.
- Desai, D.M., Sap, J., Schlessinger, J. y Weiss, A. (1993) *Cell* **73**: 541-554.
- Dorfman, R.I. (1957) *Cancer Res.* **17**: 535-536.
- Eipper, B.A., Mains, R.E. y Guenzi, D.C. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 4121-4129.
- Evans, G.A., García, G.G., Erwin, R., Howar, O.M. y Farrar, W.L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 23407-23412.
- Ewald, W., Werbin, H. y Chaikoff, I.L. (1964) *Biochem. Biophys. Acta* **81**: 199-201.
- Fantus, I.G., Kadota, S., Deragon, G., Foster, B. y Postner, B.I. (1989) *Biochemistry*, **28**: 8864-8871.
- Ferguson, J.J.Jr. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 2754-2759.
- Feuilloley, M., Netchitailo, P., Lihmann, I. y Vaudry, H. (1986) *J. Steroid Biochem.* **25**: 143-147.
- Feuilloley, M., Contesse, V., Lefebvre, H., Delarue, C. y Vaudry, H. (1994) *Am. J. Physiol.* **266** (Endocrinol. Metab. 29): E202-E210.
- Feuilloley, M. y Vaudry, H. (1996) *Endocrine Review* **17** (3): 269-288.
- Finkielstein, C.V., Maloberti, P., Méndez, C.F., Paz, C., Cornejo Maciel, F., Cymeryng, C. Neuman, I., Dada, L., Mele, P.G., Solano, A. y Podestá, E.J. (1998) *Eur. J. Biochem.* **256** (1): 60-66.
- Flint, A., Gebbink, M.F.G.B., Franza, B.R., Hill, D.E. y Tonks, N.K. (1993) *EMBO J.* **12** (5): 60-66,
- García Morales, P., Minami, Y., Luong, E. y Klausner, R.D.(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9255-9259.
- Garren, L.D., Ney, R.L. y Davis, W.W. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**: 1443-1450.
- Garton, A.J. y Tonks, N.K. (1994) *EMBO J.* **13** (16): 3763-3771.

- González Reyes, J., Santana, P., González Robaina, I., Cabrera Oliva, J., Estévez, F., Hernández, I., López Blanco, F., Quintana Aguiar, J., Fanjul, L.F. y Ruiz de Galarreta, C.M. (1997) *J. Endocrinol.* **152** (1): 533-540.
- Guderman, T., Birnbaumer, M. y Birnbaumer, L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 4479-4488.
- Guo, H., Reddy, S.A.G. y Damuni, Z. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 11193-11198.
- Guo, H. y Damuni, Z. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2500-2504.
- Han, J.D. y Rubin, C.S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** (46): 29211-29215.
- Haynes, R.C.Jr (1958) *J. Biol. Chem.* **233**: 1220-1222.
- Hecther, O., Zaffaroni, A., Jacobsen, R.P., Levy, H., Jeanloz, R., Schenker, V. y Pincus, G. (1951) *Recent. Prog. Horm. Res.* **6**: 215-246.
- Heinrikson, R.L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**: 299-307.
- Hofmann, K., Stehle, C.J. y Finn, F.M. (1988) *Endocrinology* **123**: 1355-1363.
- Huang, F.L. y Glinsmann, W.H. (1976) *Eur. J. Biochem.* **70** (2): 419-426.
- Ingetbrisen, T.S. y Cohen, P. (1983a) *Eur. J. Biochem.* **132**: 255-261.
- Ingetbrisen, T.S. y Cohen, P. (1983b) *Science* **221**: 331-337.
- Ishihara, H., Martin, B., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto K., Huemura, D. y Hartshorne, D.J. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1159**: 871-877.
- Iyer, R. B., Chauhan, A. y Koritz, S.B. (1988) *Mol. Cell.Endocrinol.* **60**: 61-69.
- Jefcoate, C.R., Di Bartolomeis, M.J. y McNamara, B.C. (1987) *J. Steroid Biochem.* **238**: 2754-2759.
- Johnson, A.L., Tilly, J.L. y Levorse, J.M. (1991) *Biol. Reprod.* **44**: 338-344.
- Jones, D.B., Marante, D., Williams, C. y Edwards, C.R.W. (1987) *J. Endocrinol.* **112**: 253-258.
- Karaboyas, G.S. y Koritz, S.B. (1965) *Biochemistry* **4**: 462-468.
- Koritz, S.B. y Kumar, A.M. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 152-159.
- Kuhné, M.R., Pawson, T., Lienhard, G.E. y Feng, G.S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 11479-11481.
- Krueger, R.J. y Orme-Johnson, N.R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 10159-10167.

- Kruskemper, H.L., Forchielli, E. y Ringold, H. (1965) *Steroids* **3**: 295-309.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**: 680-685.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Kjelsberg, M.A., Pitcher, J., Koch, W.J., Inglese, J. y Caron, M.G. (1993) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**: 1-9.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MacKintosh, C. y Klumpp, S. (1990) *FEBS Lett.* **277 (1-2)**: 137-140.
- Mayer-Jackel, R.E. y Hemmings, B.A. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**: 278-291.
- McFarland, K.C., Sprengel, R., Phillips, H.S., Kohler, M., Rosembil, N., Nickolis, K., Segaloff, D.L. y Seeburg, P.H. (1989) *Science* **245**:494-499.
- Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y. e Igarashi, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**: 525-528.
- Mendelson, C., Dufau, M. y Katt, K. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 8818-8821.
- Mrotek, J.J., Hall, P.F. y Lacko, I. (1982) *Experientia* **(38)**: 1107-1110
- Neel, B.G. y Tonks, N. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.***9**: 193-204.
- Neher, R. y Milani, A. (1978) *Mol. Cell. Endocrinol.* **9**: 243-253.
- Nicolis, G.L. y Ulick, S. (1965) *Endocrinology* **76**: 514-521.
- Pascualini, J.R. (1964) *Nature* **201**: 501.
- Paz, C., Dada, L., Cornejo Maciel, M.F., Mele, P.G., Cymeryng, C.B., Neuman, I, Méndez, C.F., Finkielstein, C.V., Solano, A.R., Park, M., Fisher, W., Towbin, H., Scartazzini, R. y Podestá, E.J. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**: 709-716.
- Penhoat, A., Jaillard, C. y Sáenz, J. (1993) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **44**: 21-27.
- Phillips, H.J. (1973) In: *Tissue Culture: Methods and Applications*, Eds.: P.I. Kruse y M.K. Patterson (Academic Press, New York) pp.406-408.
- Podestá, E.J., Duffau, M. y Catt, K. (1976) *Mol. Cell. Endocrinol.* **5**:109-122.
- Podestá, E.J., Duffau, M. y Catt, K. (1978) *Biochemistry* **17**:1566-1573.
- Podestá, E.J., Milani, A., Steffen, H. y Neher, R. (1979) *Biochem. J.* **180**:355-363.
- Pon, L.A. y Orme-Johnson, N.R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**:6594-6599.

- Raikhinstein, M., Zohar, M. y Hanukloglu, I. (1994) *Biochem. Biophys. Acta* **1220**: 292-332.
- Ramachandran, J., Muramoto, K., Kenez-Keri, M., Keri, G. y Buckley, D.I. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3967-3970.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. y Krans, H.M.J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**: 1872-1882.
- Roemmerts F., Cooke, B. y van der Molen H. (1974) *J. Steroid Biochem.* **254**:3861:3865.
- Sala, G. Hayoshi, K., Catt, K. y Dufau, M. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**:3861-3865.
- Sayed, S.B., Whitehouse, B.J. y Jones, P.M. (1997) *J. Mol. Endocrinol.* **154**:449-458.
- Schievella, A.R., Paige, L.A., Johnson, K.A., Hill, D.E. y Erikson, R.L. (1993) *Cell Growth Differ.* **3**: 239-246.
- Secrist, J.P., Burns, L.A., Karnitz, L., Koretzky, G.A. y Abraham, R.T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:5886-5893.
- Shenolikar, S. e Ingebritsen, T.S. (1984) *Methods In Enzimology*, Vol. 17. Academic Press.
- Shenolikar, S. *An Rev Cell Biol* **10**, 55-86 (1994).
- Shifrin, V.I., Davis, R.J. y Neel, B.G. (1996) *J. Biol. Chem.* **272** (5): 2957-2962.
- Simpson, E.R., Lund, J., Ahlgren, R. y Watrman, M.R. (1990) *Mol. Cell. Endocrinol.* **70**: C25-C28.
- Solano, A.R., Dada, L.A., Sardaños, M.L., Sánchez, M.L. y Podestá, E.J. (1987) *J. Steroid Biochem.* **27(4-6)**: 745-751.
- Solano, A.R., Dada, L.A. y Podestá, E.J. (1988) *J. Mol. Endocr.* **1**:147-154.
- Solomon, S., Levitan, P. y Lieberman, S. (1956) *Rev. Can. Biol.* **15**: 282-288.
- Stocco, D.M. y Ascoli, M. (1993) *Endocrinology* **132(3)**: 959-966.
- Stocco, D.M. y Sodeman, T.C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 19731-19738.
- Svensson, L.T., Engberg, S. T., Aoyama, T., Usuda, N., Alexson, S. E. H. y Hashimoto, T. (1998) *Biochem. J.* **329**: 601-608.
- Swarup, G., Cohen, S. y Garbers, D.L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

107, 1104.

-Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Vanengen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. y Schmitz, F.J. (1981) Journal of the American Chemical Society **103**: 2469-2471.

-Tonks, N.K., Diltz, C.D. y Fischer, E.H. (1988b) J. Biol. Chem. **263**: 6722-6730.

-Tonks, N.K., Diltz, C.D. y Fischer, E.H. (1988c) J. Biol. Chem. **263**: 6731-6737.

-Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H. (1990) J. Biol. Chem. **265**: 10674-10680.

-Towbin, H., Stachelin, T. y Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350.

-Vilgrain, I., Chinn, A., Gaillard, I., Chambaz, E.M. y Feige, J.J. (1998) Biochem. J. **1**: 533-540.

-Wade, M.G., Van der Kraak, G., Gerrits, M.F. y Ballantyne, J.S. (1994) Biol. Reprod. **51**: 131-139.

-Walton, K.M. y Dixon, J.E.(1993) Ann. Rev. Biochem. **62**: 101-120.