

## Tesis de Posgrado

# Relación y función de proteínas citosólicas y mitocondriales activadoras de esteroidogénesis : Regulación hormonal de una acil-CoA tioesterasa-intermediaria en la esteroidogénesis - en corazón, un tejido no esteroidogénico

Neuman de Kurlat, María Isabel

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Neuman de Kurlat, María Isabel. (2001). Relación y función de proteínas citosólicas y mitocondriales activadoras de esteroidogénesis : Regulación hormonal de una acil-CoA tioesterasa-intermediaria en la esteroidogénesis - en corazón, un tejido no esteroidogénico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3361\\_NeumandeKurlat.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3361_NeumandeKurlat.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Neuman de Kurlat, María Isabel. "Relación y función de proteínas citosólicas y mitocondriales activadoras de esteroidogénesis : Regulación hormonal de una acil-CoA tioesterasa-intermediaria en la esteroidogénesis - en corazón, un tejido no esteroidogénico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3361\\_NeumandeKurlat.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3361_NeumandeKurlat.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Relación y función de proteínas citosólicas y  
mitocondriales activadoras de la  
esteroidogénesis**

Regulación hormonal de una acil-CoA tioesterasa  
- intermediaria en la esteroidogénesis - en corazón, un tejido  
no esteroidogénico.

Lic. María Isabel Neuman de Kurlat

Director: Prof. Dr. Ernesto J. Podestá

Departamento de Bioquímica Humana  
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

2001



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Relationship and function of cytosolic and  
mitochondrial proteins involved in the  
activation of steroidogenesis**

Hormonal regulation of an acyl-CoA thioesterase  
- intermediary in steroidogenesis - in heart, a non  
steroidogenic tissue.

Lic. María Isabel Neuman de Kurlat

Director: Prof. Dr. Ernesto J. Podestá

Departamento de Bioquímica Humana  
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

Thesis submitted for the Ph degree of the University of  
Buenos Aires

2001

## **RESUMEN**

La proteína ARTIS<sub>t</sub> (Arachidonic acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis) es miembro de una nueva familia de acil-CoA tioesterasas recientemente caracterizadas que catalizan la liberación de ácidos grasos de cadena larga utilizando como sustrato acil-CoAs. Se ha comprobado que esta proteína interviene en la liberación de ácido araquidónico por estimulación hormonal en tejidos esteroideogénicos, siendo éste un paso obligatorio en el control de la esteroideogénesis.

La proteína ARTIS<sub>t</sub> fue detectada tanto en tejidos esteroideogénicos, como no esteroideogénicos. Dado que se encontró una alta expresión de la proteína en corazón y el ácido araquidónico cumple un rol esencial en la función cardíaca, el objetivo del presente trabajo de Tesis fue investigar si ARTIS<sub>t</sub> es activa en tejido cardíaco y si la activación y expresión de la misma pueden ser regulados por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Los resultados muestran que ARTIS<sub>t</sub> es activa en tejido cardíaco y su bioactividad puede ser regulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos a través de la estimulación de los sistemas de transducción AMPc-dependientes.

Los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos regulan también los niveles del ARN mensajero de ARTIS<sub>t</sub>. Se ha demostrado que los aumentos en la abundancia del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> son al menos, debidos a un aumento en la transcripción. Por otra parte, la abundancia del ARN mensajero de ARTIS<sub>t</sub> aumentó cuando las ratas fueron sometidas a ayuno.

Estos resultados sugieren la existencia de un nuevo camino de liberación de ácido araquidónico en tejido cardíaco regulado por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Este sistema puede representar un camino alternativo o paralelo al de la fosfolipasa A<sub>2</sub> para la regulación hormonal de los niveles intracelulares de ácido araquidónico.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido araquidónico, Acil-CoA tioesterasa, tejido cardíaco, isoproterenol, receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

## **ABSTRACT**

ARTIST (Arachidonic acid Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis) is member of a recently characterized family of acyl-CoA thioesterases that are involved in the hydrolysis of the thioester linkage of very long-chain fatty acids, using acyl-CoAs as substrates. It has been demonstrated that this protein is involved in arachidonic acid release by hormonal stimulation in steroidogenic tissues, an obligatory pathway in steroidogenesis control.

ARTIST has been detected in steroidogenic and non steroidogenic tissues. Given the presence of ARTIST in heart and the involvement of arachidonic acid in the regulation of cardiac function, the aim of the present work was to determinate if ARTIST is active in cardiac tissue and if activation and expression of ARTIST could be regulated by  $\beta$ -adrenergic agonists.

The results show that ARTIST presents activity in cardiac tissue and its bioactivity can be regulated by  $\beta$ -adrenergic agonists through the stimulation of cAMP-dependent transduction pathways.

$\beta$ -adrenergic agonists also regulate the mRNA levels of cardiac ARTIST. It has been demonstrated that the increase of the abundance of ARTIST mRNA is, at least, due to enhanced transcription. Otherwise, starvation also increased the abundance of ARTIST mRNA.

These results suggest the existence of a new pathway of arachidonic acid release in cardiac tissue regulated by  $\beta$ -adrenergic agonists. This system can represent an alternative or parallel pathway to phospholipase A<sub>2</sub> for the hormonal regulation of the intracellular levels of arachidonic acid.

**KEY WORDS:** Arachidonic acid, acyl-CoA thioesterase, cardiac tissue, isoproterenol,  $\beta$ -adrenergic receptors.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ernesto J. Podestá, mi Director de Tesis, Jefe del Laboratorio de Hormonas en la Regulación y Diferenciación Celular y Director del Departamento de Bioquímica Humana de la Facultad de Medicina, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su Laboratorio y guiado todos estos años, por la formación científica que me brindó y sobre todo por estar siempre lleno de ideas nuevas, proyectos y esperanza en el futuro.

Al Dr. Juan José Poderoso, Jefe del Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno del Hospital de Clínicas, por haber aceptado colaborar en la realización de los experimentos de perfusión cardíaca en su Laboratorio y haberme recibido siempre con gran cordialidad y calidez.

A la Dra. Cristina Paz, por haber sido mi amiga, compañera de trabajo, consejera, correctora de la Tesis, por haberme soportado en momentos difíciles y siempre darme el ánimo necesario para transitar el arduo camino de realización de la Tesis.

A Paula Maloberti y Constanza Lisdero, que me ayudaron y enseñaron con gran paciencia y disposición y que sin su apoyo no podría haber realizado los experimentos de Biología Molecular y la perfusión de corazones.

A mis compañeros de Laboratorio: Cristina, Paula, Cora, Fabiana, Carlos y Pablo, por tantas horas de trabajo compartidas, tantos cafés, tantas discusiones, tantos congresos, tantas sobremesas, tantos seminarios, tantos viajes y tantas anécdotas. Y también a los más jóvenes: Cecilia P, Alejandra, Cecilia C, Sebastián, Paula B, Forencia, Luciana, Natalia, Yael y Sabrina con los cuales también estamos empezando a hilvanar recuerdos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, que siempre me hicieron sentir una más del equipo de trabajo.

A mis padres, Pili y Pepe, por haberme enseñado con su ejemplo la senda del estudio y del trabajo; a mis hijos, Flor y Ale, por ser la alegría más grande de mi vida, y a Danny, por ser mi compañero desde hace ya más de veinte años, por haberme estimulado permanentemente, haber tenido tanta comprensión y paciencia y demostrado con su amor la importancia de valorar los esfuerzos cotidianos que son los que en definitiva van forjando los grandes logros.

### **TRABAJOS PUBLICADOS A PARTIR DE RESULTADOS DE LA TESIS:**

Finkielstein CV, Cymeryng C, Paz C, Neuman I, Dada L, Cornejo Maciel F, Mele PG, Mendez CF, Maloberti P, Solano AR, Schimmer BP y Podestá EJ (1996) Characterization of the cDNA corresponding to a phosphoprotein (p43) intermediary in the action of ACTH. *Endocrine Research* **22(4)**:521-532.

Neuman I, Lisdero C, Finkielstein C, Maloberti P, Mendez CF, Poderoso JJ y Podestá EJ (1999) Activation of a thioesterase specific for very-long-chain fatty acids by adrenergic agonists in perfused hearts. *Biochim Biophys Acta* **1451**:101-108.

### **MANUSCRITO EN PREPARACIÓN:**

Neuman I, Maloberti P, Lisdero C, Poderoso JJ, Podestá EJ. Isoproterenol regulates the transcription of an arachidonic acid-releasing acyl-CoA thioesterase in cardiac tissue.

## **ABREVIATURAS**

AA	Ácido araquidónico
ACBP	Acyl-CoA binding protein
ACS4	Acil-CoA sintetasa-4
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
5'AMP	5'Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ART1st	Arachidonic acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis
ATP	Adenosina trifosfato
BPB	Bromuro de p-bromo fenacilo
8-Br AMPc	8-Bromo adenosina monofosfato cíclico
BSA	Albúmina de suero bovino
CG	Gonadotrofina coriónica
CoA	Coenzima A
DBI	Diazepam binding inhibitor
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
ES	Error standard
ETYA	Ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico
FSH	Hormona folículo estimulante
GTP	Guanosina trifosfato
IgG	Inmunoglobulina G
ISOP	Isoproterenol
kDa	kiloDalton
KHB	Solución Krebs-Henseleit
LH	Hormona luteinizante
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDGA	Ácido nordihidroguayarético
P450scc	Sistema de ruptura de la cadena lateral del colesterol
pb	pares de bases
PBR	Receptor periférico de benzodiazepinas
PBS	Solución fosfosalina
PMTS	Sobrenadante post-mitocondrial.
PP	Proliferadores de peroxisomas
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Sodio dodecil-sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SNC	Suero normal de conejo
StAR	Steroidogenic Acute Regulator
7-TMS	7-Segmentos transmembrana

## ***ÍNDICE***

## **INTRODUCCIÓN**

<b>I- REGULACIÓN AGUDA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS</b> .....	1
I-1- Esteroidogénesis: Hormonas y tejidos productores de esteroides.....	1
I-2- Mecanismo de transducción de señales desencadenados por hormonas esteroidogénicas .....	2
I-2- a- Interacción con receptores de la membrana plasmática.....	2
I-2- b- Generación de segundos mensajeros.....	3
I-2- c- Activación de proteín-quinasas y fosforilación de proteínas.....	4
I-2- d- Activación de proteín-fosfatasa y desfosforilación de proteínas.....	9
I-2- e- Rol del ácido araquidónico y sus metabolitos.....	10
I-3- Descripción de la primera etapa de la esteroidogénesi .....	14
I-4- Paso limitante de la esteroidogénesis.....	17
I-5- Proteínas que intervienen en la regulación aguda de la esteroidogénesis.....	18
I-5- a- Steroidogenic Acute Regulator (StAR).....	18
I-5- b- Arachidonic Acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis (ARTISt).....	21
I-5- c- Acil-CoA Sintetasa específica para ácido araquidónico (ACS4).....	25
I-5- d- Acyl-CoA Binding Protein (ACBP).....	26
I-6- Mecanismo propuesto para la proteína ARTISt en tejidos esteroidogénicos.....	27
<b>II- LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN TEJIDOS NO ESTEROIDOGÉNICOS</b> .....	30
II-1- Función y regulación del tejido cardíaco.....	30
II-1- a- Importancia de la función cardíaca.....	30
II-1- b- Estructura y función de las catecolaminas.....	31
II-1- c- Clasificación de los receptores adrenérgicos.....	34
II-1- d- Antagonistas de los receptores adrenérgicos.....	38
II-2- Funciones del ácido araquidónico en tejido cardíaco.....	39
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	43

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>I- REACTIVOS UTILIZADOS</b> .....	44
<b>II- ANIMALES</b> .....	45
II-1- Animales utilizados.....	45
II-2- Tratamiento y sacrificio de los animales.....	45
<b>III- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARTIST EN GLÁNDULA ADRENAL</b> .....	46
III-1- Fraccionamiento subcelular de la zona fasciculata-reticular.....	47
III-2- Medición de la bioactividad de ARTIST en adrenal.....	47
III-2- a- Ensayo homólogo de recombinación de fracciones subcelulares para evaluar la capacidad estimuladora de ARTIST.....	48
III-2- b- Incubación de las fracciones subcelulares.....	48
III-2- c- Determinación de progesterona..	48
III-2- d- Cálculo de la producción neta de progesterona en el bioensayo.....	50
<b>IV- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARTIST EN TEJIDO CARDÍACO</b> .....	51
IV-1- Aislamiento y perfusión de corazón.....	51
IV-2- Fraccionamiento subcelular.....	51
IV-3- Ensayo de recombinación de fracciones subcelulares heterólogas <i>in vitro</i> .....	52
IV-4- Incubación de los citosoles cardíacos con anticuerpos antipeptidos.....	53
<b>V- TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS</b> .....	54
V-1- Cuantificación de proteínas..	54
V-2- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	54
V-2- a- Armado de geles y electroforesis en una dimensión.....	54
V-2- b- Tinción de las proteínas.....	54
V-3- Western blot.....	55
V-3- a- Electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	55
V-3- b- Reconocimiento de ARTIST por anticuerpos antipeptidos.....	55
V-4- Detección de ARTIST en tejidos esteroideogénicos y no esteroideogénicos.....	56
V-4- a- Aislamiento y fraccionamiento subcelular de distintos órganos.....	56
V-4- b- Reconocimiento de ARTIST.....	57
<b>VI- TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DEL ARNm de ARTIST</b> .....	58
VI-1- Extracción del ARN.....	58
VI-2- Northern blot.....	59

VI-3- Cálculo de las intensidades relativas.....	60
<b>VII- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>I- DISTRIBUCIÓN TISULAR Y SUBCELULAR DE ARTIST.....</b>	<b>62</b>
I-1- Consideraciones previas.....	62
I-2- Detección de ARTIST en diversos tejidos .....	62
I-3- Detección de ARTIST en citosol y mitocondria.....	66
<b>II- ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN DE ARTIST CARDÍACA POR AGONISTAS</b>	
<b>ADRENÉRGICOS.....</b>	<b>68</b>
II-1- Efecto de la perfusión cardíaca con isoproterenol .....	68
II-2- Participación de ARTIST cardíaca en la activación observada en el ensayo de recombinación heterólogo.....	73
II-3- Curva dosis-respuesta con isoproterenol. Bloqueo con propranolol.....	76
II-4- Efecto del inhibidor de proteín-quinasa AMPc dependiente en el ensayo de recombinación heterólogo.....	78
II-5- Efecto de inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico.....	79
<b>III- ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE ARTIST EN</b>	
<b>CORAZÓN.....</b>	<b>83</b>
III-1- Presencia del ARNm de ARTIST en tejidos no esteroideogénicos.....	83
III-1- a- Detección de los transcritos de ARTIST en distintos tejidos.....	83
III-1- b- Identificación de los transcritos de ARTIST en tejido cardíaco.....	86
III-2- Regulación de los niveles del ARNm de ARTIST por agonistas $\beta$ -adrenérgicos.....	89
III-2- a- Efecto del isoproterenol y del propranolol sobre los niveles del ARNm de ARTIST.....	89
III-2- b- Efecto del 8-Br AMPc.....	92
III-2- c- Efecto del tiempo de perfusión con isoproterenol sobre los niveles de ARNm de ARTIST.....	95
III-2- d- Efecto de la actinomicina D.....	97
III-3- Efecto de los proliferadores de peroxisomas sobre los niveles del ARNm de ARTIST .....	100
III-4- Regulación de los niveles del ARNm de ARTIST por ayuno.....	104

<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	106
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	115
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	118

## ***INTRODUCCIÓN***

## **I- REGULACIÓN AGUDA DE LA ESTEROIDOGENESIS**

### **I-1- Esteroidogénesis: Hormonas y tejidos productores de esteroides.**

Las hormonas esteroideas cumplen un papel esencial en el mantenimiento de las funciones vitales del organismo. Funciones tan diversas como diferenciación sexual, desarrollo de órganos sexuales secundarios, regulación del metabolismo hidrocarbonado y mantenimiento del equilibrio hídrico entre otras son controladas por ellas. Los principales tejidos esteroideogénicos son la corteza adrenal, el testículo, el ovario y la placenta.

La síntesis de hormonas esteroideas en los distintos tejidos responde a la acción de diferentes ligandos. Por ejemplo: en la zona fasciculata y reticular de la corteza adrenal, la producción de glucocorticoides es regulada por la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), mientras que la secreción de aldosterona por las células de la glomerulosa es estimulada por Angiotensina II, ACTH y  $K^+$  (Davis, 1975; Fraser y col, 1979).

Tanto el ovario como el testículo comparten homologías estructurales y funcionales. El funcionamiento normal de las gónadas es dependiente, entre otros factores, de las gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona foliculo estimulante) sintetizadas y secretadas por la hipófisis. Se han descrito receptores para LH en las células de la teca interna del ovario y en las células de Leydig de testículo, mientras que para FSH en células de Sertoli en testículo y de las células de la granulosa del ovario. La FSH promueve la espermatogénesis en los testículos y el desarrollo de los folículos en los ovarios. La LH actúa estimulando la producción de hormonas esteroideas, fomentando principalmente la síntesis de testosterona por las células de Leydig de los testículos y de progesterona por el cuerpo lúteo de los ovarios. Otra gonadotropina, la hormona

gonadotropina coriónica (CG), es sintetizada por la placenta. Ésta actúa como la LH en la estimulación del cuerpo lúteo.

El efecto agudo o rápido de las hormonas esteroideogénicas ocurre pocos minutos después de aplicado el estímulo y puede ser distinguido temporalmente del crónico, mucho más lento, que ocurre en las horas posteriores al estímulo e involucra mecanismos que favorecen la transcripción de genes y la traducción de enzimas como las deshidrogenasas y las P<sub>450</sub>scc hidroxilasas involucradas en la síntesis de esteroides. Los efectos crónicos de la estimulación hormonal son extremadamente importantes para el mantenimiento de la capacidad esteroideogénica de los tejidos.

### **I-2- Mecanismo de transducción de señales desencadenados por hormonas esteroideogénicas.**

La secreción de hormonas esteroideas depende de la acción de diferentes ligandos de acuerdo al tejido. Si bien los mecanismos de transducción de señales promovidos por estos agonistas son esencialmente distintos, todos convergen en el paso limitante de la síntesis de esteroides, que es el transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria.

A continuación se profundizará el estudio de los mecanismos de acción de los ligandos involucrados en la síntesis de esteroides. En particular se hará hincapié en las señales de transducción originadas por LH, ACTH y Angiotensina II.

#### **I-2- a- Interacción con receptores de la membrana plasmática.**

Tanto LH, ACTH y Angiotensina II, por ser de naturaleza peptídica no pueden atravesar la membrana celular, por lo tanto inician su acción mediante la

unión a receptores ubicados en la membrana plasmática. Las moléculas que componen este tipo de receptores son proteínas integrales de membrana con características estructurales similares. Éstas pertenecen al grupo de los denominados receptores 7TMS (7 segmentos transmembrana), los cuales constituyen una familia de receptores muy amplia. Presentan siete segmentos transmembrana, con el extremo amino situado en el espacio extracelular y el extremo carboxilo en el espacio citoplasmático (Sasaki y col, 1991; Dohlman y col, 1991; Mountjoy y col, 1992; Segaloff y Ascoli, 1993; Raikhinsein y col, 1994).

Luego de producirse la interacción ligando-receptor de membrana, se produce la respuesta celular a través de mecanismos diversos. Para las hormonas que actúan vía estimulación de receptores de membrana plasmática, existen numerosos sistemas de transducción de mensajes luego de la activación de los receptores específicos. Esto se lleva a cabo mediante la formación de segundos mensajeros, que transducen su mensaje en actividades regulatorias que conducen, en último término a la modulación de la respuesta biológica.

En estos sistemas participan proteínas que unen nucleótidos de guanina, denominadas proteína G como transductoras de señales químicas a través de la membrana plasmática (Rodbell y col, 1971). Los sistemas efectores modulados por proteínas G pueden ser canales iónicos o enzimas involucradas en la síntesis y/o degradación de segundos mensajeros.

### **I-2- b- Generación de segundos mensajeros.**

Entre los sistemas que operan a través de la generación de segundos mensajeros, dos de ellos están perfectamente caracterizados en la actualidad. Uno de ellos utiliza como segundo mensajero 3', 5'-adenosina monofosfato

cíclico (AMPc) y el otro utiliza una combinación de segundos mensajeros: diacilglicerol, inositol trifosfato y iones calcio.

El rol del AMPc como segundo mensajero fue enunciado por Sutherland y Rall (Sutherland y Rall, 1958). Los niveles intracelulares de AMPc son controlados por la actividad de dos enzimas: la enzima de membrana adenilil-ciclase que cataliza su síntesis a partir del sustrato adenosina trifosfato (ATP) y la enzima fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, que cataliza su hidrólisis a 5'AMP (5'adenosina monofosfato). Las hormonas LH y ACTH utilizan este segundo mensajero como mediador en el control de la esteroidogénesis.

Los mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato son generados por un proceso que involucra la participación de al menos tres componentes: un receptor, una proteína G acoplada al receptor y una enzima, la fosfolipasa C, la cual cataliza la hidrólisis de un fosfolípido de membrana: 4,5 bifosfato fosfatidil inositol, generando los mensajeros señalados. El incremento intracelular de  $Ca^{++}$  se produce por su liberación de los depósitos intracelulares activado por inositol trifosfato (Berridge e Irvine, 1984,1989). La Angiotensina II es un ejemplo de hormona que opera en este esquema en el mecanismo de control de la esteroidogénesis.

### **I-2- c- Activación de proteín-quinasas y fosforilación de proteínas.**

Los segundos mensajeros mencionados anteriormente, entre otros, convergen en un paso en común: la fosforilación de proteínas mediante la acción de proteín-quinasas. Estas enzimas regulan la actividad de un amplio número de proteínas catalizando la fosforilación de las mismas. Mediante su activación por los segundos mensajeros, las proteín-quinasas amplifican, integran y coordinan respuestas celulares frente a cambios en el medio intra y extracelular. Éstas

conforman un grupo de proteínas de características muy variables.

Se han descrito una gran variedad de quinasas de proteínas. Si bien existe una gran diversidad entre ellas, comparten características estructurales y funcionales comunes. En particular, todas presentan un sitio catalítico conservado, por lo que se sugiere que tienen un origen común (Taylor, 1989).

La introducción o remoción de fosfato covalentemente unido causa cambios estructurales en las proteínas, que a su vez, conducen a cambios funcionales. Dependiendo del aminoácido en el cual introducen el grupo fosfato, se pueden clasificar en serina-treonina quinasas y tirosina quinasas (Krebs, 1985). Ejemplos de las primeras son la proteína-quinasa AMPc dependiente y la proteína-quinasa C. Éstas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato de la posición  $\gamma$  del ATP a un residuo serina o treonina de una proteína aceptora.

La proteína-quinasa AMPc dependiente es un tetrámero, que en su forma inactiva posee dos subunidades catalíticas y dos regulatorias (Corbin y col, 1978). La unión del AMPc a la subunidad regulatoria disminuye la afinidad de la subunidad regulatoria por la catalítica, disociando a la enzima y liberando la subunidad catalítica activa (Livesey y col, 1988). Cada subunidad regulatoria contiene dos sitios distintos para el AMPc, y es necesario que se ocupen ambos para la activación de la enzima. Existe cooperatividad positiva aparente para la unión del nucleótido a estos sitios.

La proteína-quinasa C es un único polipéptido que contiene el dominio catalítico y el regulatorio. Se han identificado nueve subtipos expresados específicamente en determinados tejidos (Coussens y col, 1986), donde se presentan diferencias en sus propiedades enzimáticas (Nishisuka, 1988). El

conjunto de estas isoformas puede dividirse en dos grupos principales: las dependientes de  $\text{Ca}^{++}$  y las independientes de  $\text{Ca}^{++}$ . El modelo de activación de las primeras incluye la unión del  $\text{Ca}^{++}$  a un dominio altamente conservado de la proteín-quinasa C con la consecuente traslocación a la membrana plasmática, donde es activada por la unión del diacilglicerol y la fosfatidilserina. Con respecto a las isoformas independientes de  $\text{Ca}^{++}$ , su activación sólo requiere del diacilglicerol y de la fosfatidilserina (Bell y Burns, 1991).

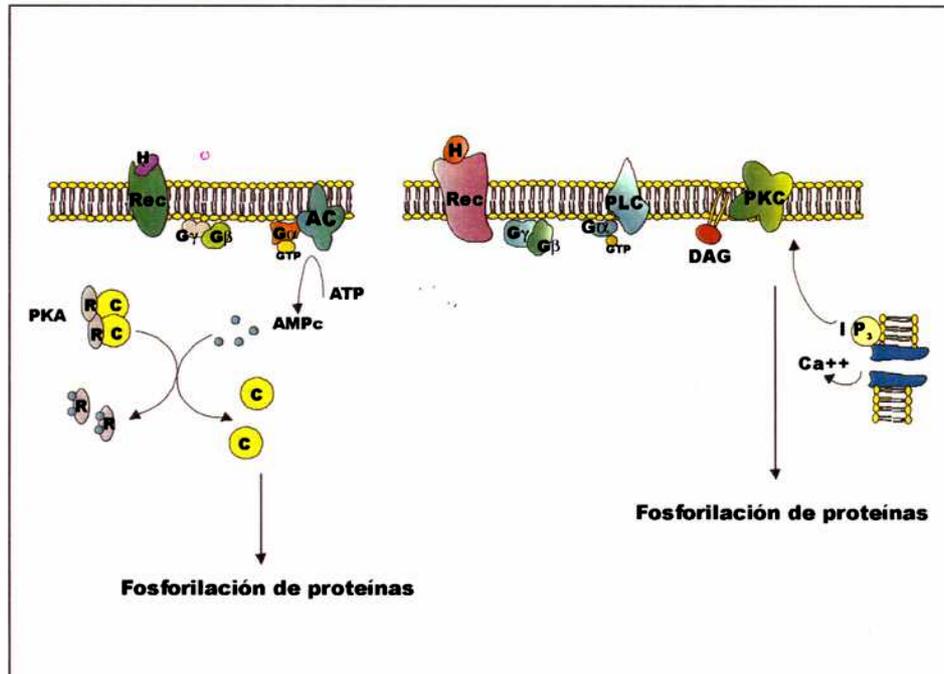
La Figura 1 ilustra los pasos generales detallados hasta este punto. De acuerdo a todo lo señalado con relación al mecanismo de transducción de señales, se puede realizar el siguiente resumen con respecto a las hormonas esteroideogénicas mencionadas al principio de la sección:

La unión de LH a su receptor 7TMS está asociado a un aumento en los niveles de AMPc (Catt y col, 1972; Dufau y col, 1975; Cooke y col, 1981), a la activación de la proteín-quinasa AMPc dependiente (Cooke y col, 1976; Podestá y col, 1976-a,b; 1978) y a la fosforilación de proteínas (Bakker y col, 1983). La acción de LH también se encuentra modulada por iones, en particular por el  $\text{Ca}^{++}$ . Este ion participa en la estimulación de la adenilil ciclase por diversos sistemas esteroideogénicos (Veldhuis y Klase, 1982; Sullivan y Cooke, 1986; Lee y col, 1989).

En el mecanismo desencadenado por ACTH, éste se une a su receptor y la transducción de la señal comprende a una proteína G estimuladora (Gs), la activación de la adenilil ciclase, el incremento en los niveles de AMPc y la activación de la proteín-quinasa AMPc dependiente (Ferguson, 1963; Tauton y col, 1967; Grahame-Smith y col, 1967; Schimmer y col, 1968; Ney y col, 1969; Beall y Sayers, 1972; Podestá y col, 1979; Sala y col, 1979). Además el  $\text{Ca}^{++}$  tendría un rol sinérgico y modulador de la acción de ACTH. Se ha postulado que

el  $\text{Ca}^{++}$  extracelular sería necesario para la unión de la hormona a su receptor específico en la célula blanco (Ramachandran, 1984) y en un paso posterior a la activación de la adenilil-ciclasa (Podestá y col, 1980).

Se ha comprobado que la Angiotensina II interviene en la síntesis de aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal mediante la activación de la fosfolipasa C. Esto lleva a la formación de inositol trifosfato, que actúa de mediadora en la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de las reservas intracelulares (Kojima y col, 1984-a) y de diacilglicerol, un activador endógeno de la proteín-quinasa C (Kojima y col, 1986). También se ha verificado que el  $\text{K}^+$  estimula la secreción de aldosterona en células de la glomerulosa adrenal (Williams y Braley, 1977), a nivel de la membrana plasmática alterando la fuerza conductora para ese ion con la consecuente modificación del potencial de membrana (Quin y col, 1987). La despolarización de la membrana observada en respuesta al  $\text{K}^+$  se traduce en la activación de canales de  $\text{Ca}^{++}$  voltaje-dependientes (Kojima y col, 1985-b). Se especula que la acción del  $\text{K}^+$  ocurre a través de la activación de la proteín-quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina (CaMKII) y posterior fosforilación de proteínas (Elliot y col, 1993).



**FIGURA 1:** MECANISMO DE ACTIVACIÓN DESENCADENADO POR HORMONAS PEPTÍDICAS.

En el gráfico se muestra un esquema general de las principales vías que pueden activarse luego de la interacción de las diferentes hormonas peptídicas con su receptor específico en la membrana plasmática.

Referencias: H: hormona; Rec: receptor; AC: adenilil ciclasa; PKA: proteína-quinasa AMPc dependiente; R y C: subunidades regulatorias y catalíticas de la PKA; PKC: proteína-quinasa C; PLC: fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol.

### **I-2-d Activación de proteín-fosfatasas y defosforilación de proteínas.**

Los mecanismos de transducción de señales convergen en procesos de fosfo-desfosforilación de proteínas que resultan del complejo balance entre las actividades de las proteínas quinasas y las proteínas fosfatasas. Éste es un mecanismo ampliamente utilizado en el control de procesos celulares. Los blancos celulares sujetos a este proceso incluyen desde enzimas metabólicas, proteínas contráctiles o estructurales, receptores hormonales y canales iónicos, hasta proteínas involucradas en la síntesis proteica y en la expresión génica.

Las proteínas fosfatasas se clasifican según el residuo del cual remueven el grupo fosfato, encontrándose fosfatasas de serina/treonina y fosfatasas de tirosina. Un tercer grupo lo constituyen las fosfatasas ácidas y alcalinas que no presentan especificidad de sustrato. Se ha descrito la participación tanto de serina/treonina fosfatasas como de tirosina fosfatasas en la regulación de la esteroidogénesis (Abayasekara y col, 1996; González Reyes y col, 1997; Sayed y col, 1997; Paz y col, 1999; Whitehouse y col, 2000).

En contraste con los procesos de fosforilación que han sido ampliamente estudiados, los procesos de defosforilación involucrados en la esteroidogénesis aún no han sido elucidados completamente. Si bien el papel general de las fosfatasas está implicado en el cierre de la activación de fosfoproteínas desencadenada por las quinasas, se han descrito otros procesos ligados a la regulación de la esteroidogénesis en los cuales las fosfatasas cumplen un importante rol modulador. Existen evidencias que indicarían que la activación de determinadas proteínas fosfatasas es obligatoria para la estimulación de la esteroidogénesis.

Se ha descrito un rápido aumento en la actividad de tirosina fosfatasas

en zona fasciculata de adrenal estimuladas por ACTH (Paz y col, 1999) y en células MA-10 estimuladas por CG (Cornejo Maciel y col, 1999). Incluso se ha demostrado que la acción de ACTH produce la desfosforilación de diferentes proteínas en adrenal de rata, en células adrenocorticales Y1 (Han y Rubin, 1996) y en células adrenales bovinas (Vilgrain y col, 1998). Más recientemente se ha demostrado que una de las tirosina fosfatasas activadas por mecanismos ACTH y AMPC dependientes es la tirosina fosfatasa denominada PTP-1D (Rocchi y col, 2000).

Por otra parte, se ha encontrado que inhibidores de las serina/treonina fosfatasas producen una disminución notable de la producción de esteroides en células MA-10 estimuladas por hormona o segundos mensajeros (Poderoso y col, 2000).

### **I-2- e- Rol del ácido araquidónico y sus metabolitos.**

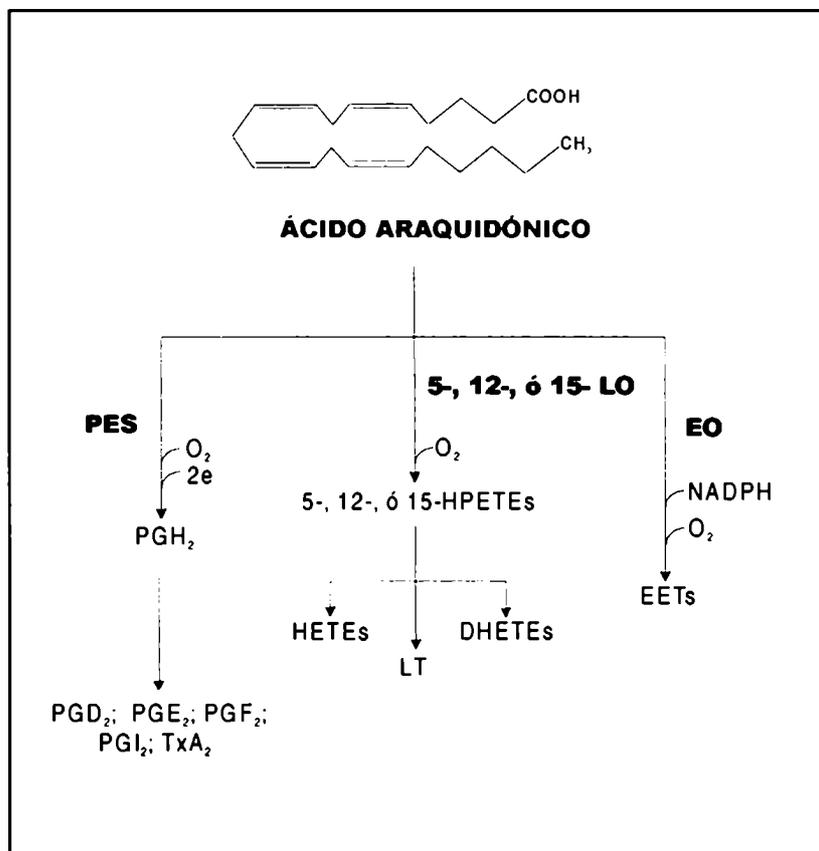
Numerosos trabajos confirman el hecho que el ácido araquidónico (AA) juega un papel fundamental en el mecanismo de estimulación aguda de la síntesis de esteroides. La activación de quinasas y la consiguiente fosforilación de proteínas llevan a la regulación de la liberación de AA en tejidos esteroideogénicos. Se ha demostrado que en corteza adrenal (Kojima y col, 1985-a; Solano y col, 1987,1988), células de Leydig (Dix y col, 1984; Cooke y col, 1991; Mele y col, 1996,1997) y células de la granulosa (Van Voorhis y col, 1993), los metabolitos del AA tienen un rol imprescindible en la respuesta celular a la hormona respectiva.

El AA se metaboliza originando una serie de compuestos de importancia biológica, como las prostaglandinas y los leucotrienos, conocidos colectivamente como eicosanoides.

El metabolismo del AA ocurre a través de tres rutas:

- 1- La vía de la ciclooxigenasa, que conduce a la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.
- 2- La vía de la lipooxigenasa que lleva a la formación de leucotrienos y ciertos ácidos hidroxilados.
- 3- El camino de la epooxigenasa que genera epoxiácidos.

La Figura 2 esquematiza las posibles vías en las que se puede metabolizar el AA.



**FIGURA 2: METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.**

En la Figura se señalan los principales metabolitos del AA y las enzimas involucradas en su formación.

Referencias: PES: prostaglandina endoperóxido sintetasa; LO: lipooxigenasa; EO: epooxigenasa; PG: prostaglandina; Tx: tromboxano; LT: leucotrieno; HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; EET: ácido epoxieicosatrienoico; DHETE: ácido dihidroxieicosatetraenoico.

Está aceptado que el AA y sus metabolitos lipooxigenados juegan un papel obligatorio en el mecanismo de LH y ACTH (Dix y col, 1984; Jones y col, 1987; Solano y col, 1987-1988; Abayasekara y col, 1990; Mikami y col, 1990; López-Ruiz y col, 1992; Mele y col, 1997). Numerosos autores postulan que debido a la activación hormonal, el subsecuente metabolismo del AA puede seguir la vía de la lipooxigenasa a leucotrienos (Morris y col, 1982; Jones y col, 1987).

Utilizando inhibidores de las enzimas que participan en la metabolización del AA, estructuralmente no relacionados, se comprobó que la inhibición de la vía de la lipooxigenasa bloqueaba la producción de testosterona y pregnenolona estimulada por LH y también por dibutiril-AMPc. En contraste, los inhibidores de vía de la ciclooxigenasa no produjeron tal inhibición (Hirai y col, 1985; Sullivan y Cooke, 1985; Jones y col, 1987; Solano y col, 1988). Se postuló que la liberación y metabolismo del AA por la vía de la lipooxigenasa media la acción de las hormonas esteroideogénicas en un punto situado entre la formación de AMPc y el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna, ya que el 22R-OH colesterol, un análogo permeable del colesterol, revertía el efecto inhibitorio observado (Abayasekara y col, 1990).

Con el fin de identificar los metabolitos lipooxigenados, se investigaron las movilidades en cromatografías en capa delgada de los productos formados luego de la activación hormonal. Éstos tuvieron movilidades semejantes a los ácidos 5- y 12- hidroxí-eicosatetraenoicos y al leucotrieno LTB<sub>4</sub> (Dix y col, 1984). Estudios posteriores utilizando un radioinmunoensayo específico para el leucotrieno LTB<sub>4</sub> demostraron que éste se forma en las células de Leydig de rata (Sullivan y Cooke, 1985) y es secretado al fluido intersticial del testículo de rata (Abayasekara y col, 1990). Además, se ha observado que productos del metabolismo del AA por la vía de la lipooxigenasa muestran un efecto

estimuladorio sobre la esteroidogénesis, entre ellos los ácidos 5- y 15-hidroperoxieicosatetraenoicos (Tamura y col, 1987; Nishikawa y col, 1994).

El conjunto de estos resultados indica que en diferentes sistemas esteroidogénicos, la activación hormonal regula la liberación del AA. Además de producirse un aumento en la liberación de AA, éste se metaboliza por la vía de las lipooxigenasas y los diferentes productos de esta ruta están involucrados en el mecanismo de acción de las hormonas esteroidogénicas.

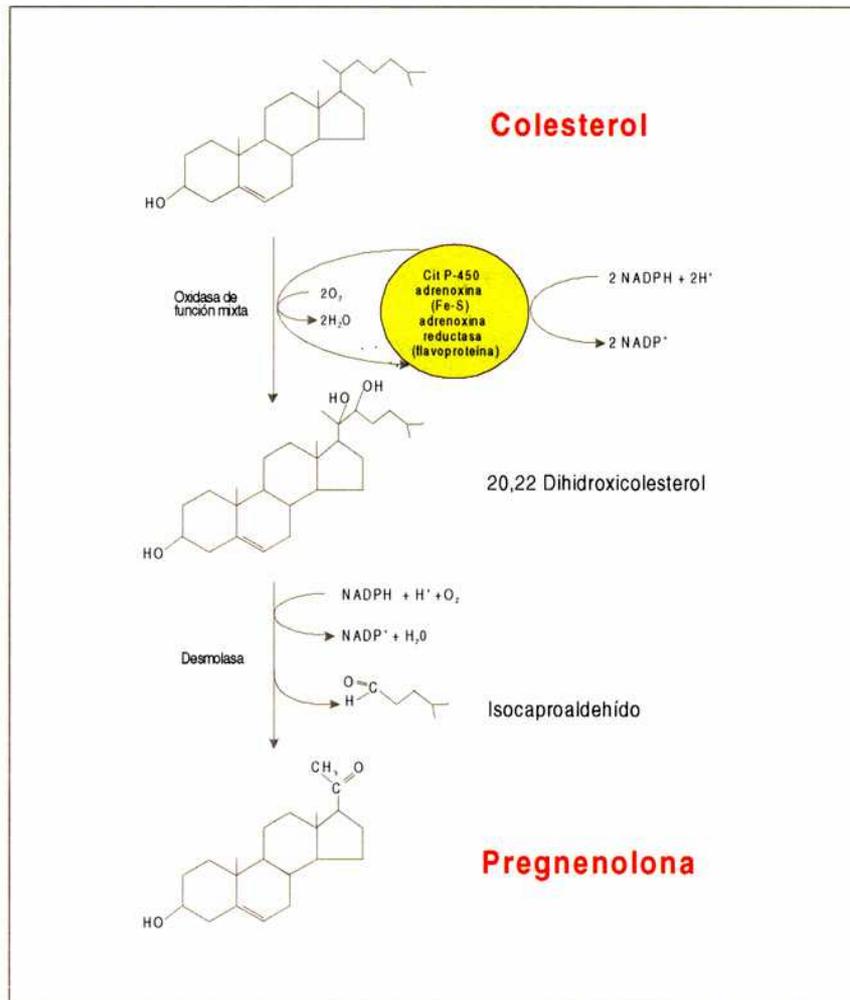
### **I-3- Descripción de la primera etapa de la esteroidogénesis.**

La esteroidogénesis es un proceso crucial para todas las especies animales. Aún cuando es una vía que responde a una gran variedad de estímulos, cuyos productos pueden variar de especie en especie y pueden ser diferentes de acuerdo al tejido y al compartimiento subcelular; la primera etapa es igual en todos los casos. Todas las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir de un sustrato común: el colesterol y más aún; el primer paso de la síntesis también es idéntico en todos los casos.

La síntesis de las hormonas esteroideas comienza con el clivaje de la cadena lateral del colesterol para dar pregnenolona e isocaproaldehído. Esta reacción ocurre en la mitocondria; lo que involucra el pasaje del colesterol a la membrana interna de la mitocondria para ser clivado por un sistema enzimático y ser convertido en pregnenolona (Karaboyas y Koritz, 1965).

La conversión de colesterol a pregnenolona ocurre muy rápidamente en células esteroidogénicas en respuesta a estímulos hormonales de la hipófisis anterior. Esta reacción es catalizada por el citocromo P<sub>450</sub>scc, que es parte del sistema enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol o CSCC

(cholesterol side chain cleavage) y está localizado en la membrana mitocondrial interna (Simpson y Boyd, 1966,1967; Yago e Ichii, 1969; Churchill y Kimura, 1979). Este complejo multienzimático está compuesto por una flavoproteína conocida como la adrenodoxina reductasa y por una hemoproteína, la adrenodoxina, que funcionan como un sistema de transporte de electrones; transfiriendo los equivalentes de reducción del NADPH al P<sub>450</sub>SCC (Lambeth y col, 1979; Tuls y col, 1987). El sitio de unión a colesterol en el P<sub>450</sub>SCC está asociado con la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna (Seybert y col,1979). La Figura 3 muestra el mecanismo involucrado en la conversión de colesterol a pregnenolona.



**FIGURA 3:** ESQUEMA DE LA CONVERSIÓN DE COLESTEROL EN PREGNENOLONA.

La Figura muestra el sistema enzimático por el cual se produce la remoción de la cadena lateral del colesterol y éste se transforma en pregnenolona.

#### **I-4- Paso limitante de la esteroidogénesis.**

Se ha demostrado que tanto la reacción catalizada por el sistema de ruptura de la cadena lateral del colesterol como el aporte de equivalentes de reducción no representan el paso limitante en la transformación de colesterol en pregnenolona (Hanukoglu y Hanukoglu, 1986).

Múltiples pruebas experimentales señalan que el verdadero paso limitante de la estimulación hormonal es la disponibilidad del colesterol en la membrana mitocondrial interna (Karaboyas y Koritz, 1965; Simpson y col, 1979; Crivello y Jefcoate, 1980; Privalle y col, 1983; Jefcoate y col, 1987).

El colesterol intracelular se moviliza en respuesta a la estimulación por una hormona trófica en un proceso que ocurre en dos etapas. En la primera etapa, se produce la movilización de las reservas celulares de colesterol hacia la membrana mitocondrial externa, mientras que en la segunda etapa se transfiere el colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna (Liscum y Dahl, 1992).

Se ha observado que análogos hidroxilados del colesterol como el 22R-colesterol, 20  $\alpha$ -OH colesterol o 25-OH colesterol pueden difundir fácilmente a través de las membranas mitocondriales y resultar sustratos adecuados para el P<sub>450</sub><sup>scc</sup>. De esta forma se pueden sintetizar esteroides aún en ausencia de estímulos hormonales (Tuckey y Atkinson, 1989; Tuckey, 1992). Por lo tanto, la transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa al P<sub>450</sub><sup>scc</sup> debe considerarse el paso limitante.

### **I-5- Proteínas que intervienen en la regulación aguda de la esteroidogénesis.**

El mecanismo por el cual el colesterol, que es uno de los lípidos más hidrofóbicos, es transportado desde los depósitos lipídicos o desde su lugar de síntesis hacia la mitocondria y luego atraviesa la doble membrana mitocondrial hacia la vecindad del  $P_{450scc}$  es un proceso que todavía no ha sido enteramente comprendido. Tanto el movimiento del colesterol hacia la mitocondria como el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial externa hacia el espacio intermembrana hidrofílico y luego hacia la membrana mitocondrial interna permanece sin ser elucidado completamente.

Se han postulado varias proteínas que regulan el paso limitante de la esteroidogénesis, y actualmente esto es motivo de una amplia gama de publicaciones que han ayudado a que este complejo proceso sea comprendido más claramente. En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de estudios con la finalidad de encontrar y caracterizar las proteínas que participan en la regulación aguda de la esteroidogénesis y su posible interrelación. En la presente sección se describirán las proteínas que han sido postuladas como reguladoras de este complejo proceso.

#### **I-5- a- Steroidogenic Acute Regulator (StAR).**

La proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulator), fue descrita inicialmente por el grupo de Orme-Johnson (Krueger y Orme-Johnson, 1983; Pon y col, 1986). En trabajos preliminares, este grupo de trabajo identificó en células adrenales estimuladas con ACTH una fosfoproteína de 30 kDa con varios grados de fosforilación que era sintetizada *de novo*. Demostraron que había una correlación entre la síntesis de esta proteína y la producción de corticosterona

luego de la estimulación hormonal, tanto en su cinética como en el efecto dosis-respuesta. Los mismos autores demostraron que la cicloheximida, un compuesto que inhibe la síntesis proteica, disminuía los niveles de algunas de las isoformas precursoras. También comprobaron que la localización de la proteína madura era mitocondrial y que los precursores se sintetizaban en el citosol (Epstein y Orme-Johnson, 1991-a,b; Alberta y col, 1989). Posteriormente, otro grupo de investigadores (Stocco y Kilgore, 1988) realizó experimentos similares en células MA-10, una línea tumoral de células de Leydig de ratón, estimuladas con CG o dibutilil-AMPc, obteniendo conclusiones similares. Estos autores aislaron un clon de cDNA que codificaba para una proteína de 284 aminoácidos con una masa molecular calculada de 31,6 kDa. Se verificó que se trataba de una proteína novel ya que ni la secuencia de ácidos nucleicos ni la de aminoácidos presentaba homología significativa cuando se analizaron en una base de datos (Clark y col, 1994).

El hecho que esta proteína sea inducida por hormonas, sensible a cicloheximida y de gran labilidad, favorece la hipótesis que StAR es la principal proteína regulatoria en la esteroidogénesis en respuesta a hormonas tróficas. Estos criterios fueron establecidos inicialmente por Ferguson y Garren (Ferguson, 1962,1963; Garren y col, 1965-1966) y definen las condiciones que se deben cumplir para que una proteína sea intermediaria en la regulación de la esteroidogénesis.

Uno de los hallazgos más importantes que favorecen la hipótesis del papel fundamental de StAR en la regulación de la esteroidogénesis es que se encontraron mutaciones en la secuencia primaria de StAR en la hiperplasia adrenal congénita (Lin y col, 1995). La hiperplasia adrenal congénita lipoide es una enfermedad letal debido a la completa incapacidad del recién nacido de sintetizar esteroides. La falta de mineralocorticoides y glucocorticoides resulta en

la muerte a los pocos días de nacimiento si no es detectada y tratada con las adecuadas hormonas esteroideas y terapia de reemplazo salino (Bose y col, 1996). Esta enfermedad se manifiesta por la presencia de un gran contenido de colesterol y sus ésteres en la glándula adrenal y en las células de Leydig de testículo. Se observó que este efecto era debido a que los pacientes no podían convertir colesterol en pregnenolona (Hauffa y col, 1985; Lin y col, 1991,1993; Saenger y col, 1995).

A pesar que el mecanismo de acción de StAR aún no ha sido elucidado completamente, parece indudable que la transferencia de colesterol requiere la interacción, al menos transitoria, con otros componentes como proteínas, lípidos, y otros factores del exterior de la membrana mitocondrial externa que producen alteraciones que resultan en la transferencia del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna (Stocco y Clark, 1996; Kallen y col, 1998). Estos factores no sólo actúan en forma directa en la transferencia del colesterol sino también en la regulación de la proteína StAR. Entre ellos, el AA es uno de los factores que ha sido comprobado que regulan la transcripción y traducción de StAR (Wang y col, 1999-a,b, 2000). Esto ha dejado en claro que la regulación de StAR es un proceso complejo en el cual están implicados una gran variedad de factores y de co-reguladores (Stocco, 2000).

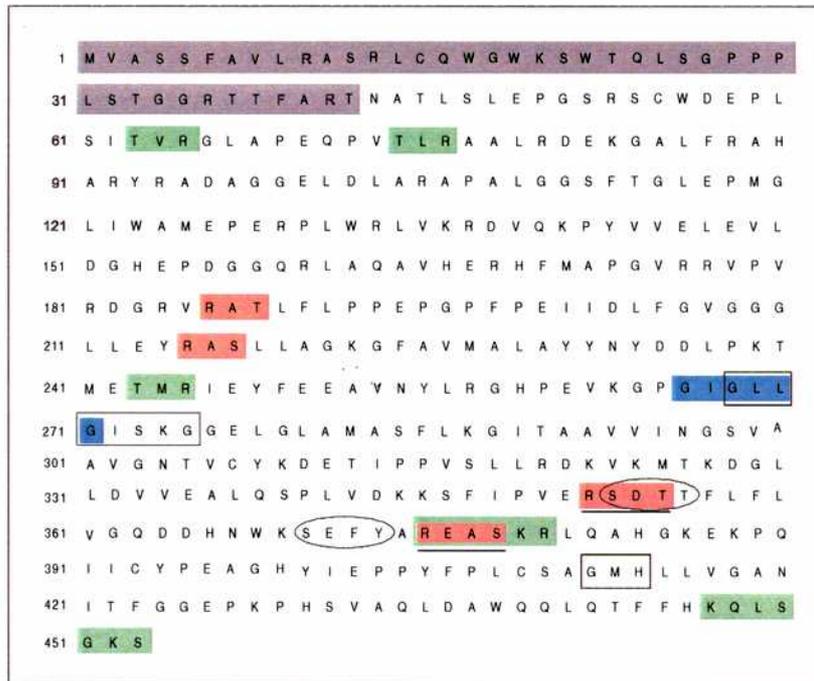
Ya ha sido mencionada la importancia del AA en relación con la regulación aguda de la esteroidogénesis. En nuestro laboratorio se ha descrito y caracterizado una enzima que interviene en la liberación de AA durante la estimulación de la síntesis de esteroides por acción hormonal. A continuación se explicará con más detalle el papel que desempeña esta proteína en el mecanismo de acción de las hormonas esteroidogénicas.

**I-5- b- Arachidonic Acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis (ARTISt).**

En trabajos realizados en nuestro laboratorio se purificó y clonó una fosfoproteína intermediaria en la liberación de AA (Paz y col, 1994; Finkielstein y col, 1998) que resultó ser homóloga a una proteína clonada en forma paralela por otro grupo de investigadores que presenta actividad de acil-CoA tioesterasa y es específica para acil-CoAs de cadena larga (Svensson y col, 1998). Dado el rol obligatorio de la proteína en la activación de la esteroidogénesis a través de la liberación de AA se propuso el nombre de ARTISt (Arachidonic acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis) para esta proteína.

La proteína ARTISt es regulada hormonalmente por LH en células de Leydig, por ACTH y Angiotensina II en adrenal y es fosforilada *in vivo* al menos en cuatro sitios. La secuencia de ARTISt presenta cuatro sitios consenso para proteín-quinasa AMPc dependiente, dos para proteín-quinasa Ca<sup>++</sup>/calmodulina dependiente, cinco para proteín-quinasa C y dos para caseín-quinasa II (Finkielstein y col, 1998) (Figura 4). La secuencia también contiene un motivo serina lipasa en el péptido G11K (*prosite motif database*), así como también un motivo Gly-XXX-His cerca del extremo carboxilo terminal. Es interesante recalcar que se ha demostrado que este motivo es necesario para la actividad hidrolítica de otras tioesterasas (Kennelly y col, 1991).

En experimentos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la incubación de extractos de adrenales estimulados con ACTH con anticuerpos antipéptidos dirigidos contra los sitios activos de la enzima, producía un bloqueo de la capacidad de dichos extractos de estimular la esteroidogénesis en un ensayo de recombinación de fracciones subcelulares *in vitro* (Finkielstein y col, 1998).



**FIGURA 4:** SITIOS CONSENSO DE ARTIST.

En la Figura se observa la secuencia de aminoácidos de la proteína ARTIST y se remarcan los posibles sitios consenso de fosforilación por distintas quinasas, el sitio de unión al ATP, el motivo de serina lipasa y la secuencia de importación a la mitocondria.

**Referencias:**



Se demostró también que el ARNm que codifica para ARTIST está presente en todos los tejidos esteroidogénicos. Se encontraron dos transcritos en ovario de rata pseudopreñada, en zona fasciculata y glomerulosa de glándula adrenal y en una línea de células tumorales de ratón (MA-10), en cambio, se detectó un solo transcrito en cerebro de rata y en placenta humana. (Finkielstein y col, 1998).

En glándula adrenal, ACTH no sólo regula a la proteína ARTIST por mecanismos de fosfo-desfosforilación, sino que también lo hace a nivel transcripcional. Se comprobó que la inyección de concentraciones crecientes de dexametasona a las ratas cinco horas antes del sacrificio disminuía en forma dosis-dependiente la abundancia del transcrito de ARTIST en adrenal. Este efecto era debido a la disminución de los niveles de ACTH circulante, ya que cuando se inyecta ACTH a distintos tiempos a ratas tratadas con dexametasona, se observa un rápido aumento de los niveles de ARN mensajero, alcanzando una máxima estimulación a los 15 minutos. Este efecto fue inhibido por actinomicina D y aumentado por cicloheximida (Finkielstein y col, 1998).

ARTIST pertenece a una familia de acil-CoA tioesterasas que catalizan la hidrólisis de los acil-CoAs de cadena larga al correspondiente ácido graso libre y CoA. En forma paralela a la purificación de ARTIST en glándula adrenal, y sin conocer que se estaba trabajando con la misma familia de tioesterasas, otros grupos de investigadores detectaron y purificaron algunos miembros de esta familia a partir de hígado de ratas tratadas con proliferadores de peroxisomas (Alexson y col, 1993; Yamada y col, 1994).

Al presente se conocen varias isoformas de la enzima con una alta homología estructural, y que poseen diferente localización subcelular. Recientemente han sido clonados el ADNc de las isoformas citosólica (CTE-I),

mitocondrial (MTE-I) y peroxisomal (PTE-Ia y PTE-Ib) (Svensson y col 1998; Lindquist y col, 1998; Finkielstein y col, 1998; Yamada y col, 1999; Hunt y col, 1999), como así también han sido clonados en ratón los cuatro genes correspondientes, que están localizados en el cromosoma 12 (Hunt y col, 1999). La isoforma MTE-I puede ser encontrada también en citosol y su actividad es regulada hormonalmente. No se conoce si es producto de la homogeneización o si también puede estar en la forma soluble.

Todas estas tioesterasas presentan sitios catalíticos semejantes, son específicas para acil-CoAs de cadena larga y comparten un motivo serin-lipasa en el grupo activo, que es diferente a otras tioesterasas anteriormente descritas en la literatura. Otra diferencia que presentan con respecto a las tioesterasas que ya habían sido caracterizadas anteriormente, es que no son sensibles a ciertos inhibidores de serín-esterasas pero sí a reactivos de grupos tioles como por ejemplo el p-cloromercuribenzoato por lo que se ha propuesto que representan un nuevo tipo de mecanismo en la hidrólisis de tioésteres (Svensson y col, 1998).

La proteína ARTIST, involucrada en la liberación de AA a partir de araquidonoil-CoA, pertenece a esta nueva familia de acil-CoA tioesterasas y es idéntica a la tioesterasa MTE-I de origen mitocondrial, descrita por el grupo de Alexson (Svensson y col, 1998). Hasta muy recientemente se consideraba que los niveles de AA intracelulares eran controlados exclusivamente por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. La caracterización de esta nueva familia de tioesterasas y la posibilidad que estas enzimas sean capaces de intervenir en la liberación de AA abre un nuevo panorama en cuanto a los mecanismos involucrados en el control de los niveles intracelulares de AA.

**I-5- c- Acil-CoA Sintetasa específica para ácido araquidónico (ACS4).**

Las acil-CoA sintetasas catalizan la formación de acil-CoA a partir de ácidos grasos, ATP y CoA. Se han encontrado distintos tipos de acil-CoA sintetasas en mamíferos, expresándose en distinto grado en diversos tejidos y entre ellas comparten un cierto grado de homología estructural, ya que todas presentan cinco regiones: una región amino-terminal, dos dominios semejantes a la luciferasa, llamados LR1 y LR2 (luciferase- like regions), un péptido conector de las dos regiones y una región carboxilo terminal (Kang y col, 1997).

Es interesante destacar que en estudios recientes se ha comprobado la alta expresión de una acil-CoA sintetasa específica para AA en tejidos esteroideogénicos. Se trata de ACS4, que puede utilizar tanto araquidonato como eicosapentaenoato con alta afinidad (Kang y col, 1997). Esta acil-CoA sintetasa de 74 kDa se encuentra preferentemente en tejidos esteroideogénicos, tales como glándula adrenal (zona fasciculata y reticular), cuerpo lúteo del ovario y células de Leydig de testículo. Se ha demostrado que existe una relación entre la presencia de ACS4 y la actividad esteroideogénica de los tejidos en donde ésta fue hallada y se ha postulado que ACS4 jugaría un papel importante en la esterificación del AA libre, ya que la expresión de ACS4 está regulada por ACTH en tejido adrenal y ovario (Cho y col, 2000).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio hemos observado que la triacsina C, un inhibidor de las acil-CoA sintetasas afecta la producción de esteroides inducida por hormonas en células Y1 de adrenal (Maloberti y col, 2000) por lo que hemos sugerido que la enzima ACS4 sería indispensable para la formación del sustrato de la enzima ARTISt.

#### **I-5- d- Acyl-CoA Binding Protein (ACBP).**

Otra proteína que interviene en el transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna por estimulación hormonal es la proteína ligadora de acil-CoAs: ACBP (Acyl-CoA Binding Protein), una proteína de 10 kDa que une acil-CoAs con alta afinidad.

Sorprendentemente, esta proteína resultó ser idéntica al inhibidor de la unión a benzodiazepinas (DBI: Diazepam Binding Inhibitor) aislado por primera vez por el grupo de Guidotti en 1983 (Guidotti y col, 1983). El DBI es una proteína que se encuentra en todos los tejidos y está altamente expresada en células esteroideogénicas (Papadopoulos, 1993). Además, esta proteína ha sido identificada como uno de los ligandos endógenos del receptor periférico de benzodiazepinas (PBR).

El PBR es un complejo multimérico mitocondrial muy abundante en células esteroideogénicas (Papadopoulos, 1993). Éste se encuentra asociado a un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Levitt, 1990; Mannella y col, 1992) y a una proteína transportadora del nucleótido de adenina (McEnery y col, 1992). Teniendo en cuenta que ACBP/DBI estimula la formación de esteroides actuando vía PBR y que se encuentra localizado preferentemente en la periferia de la mitocondrias (Schultz y col, 1992), se postuló que las hormonas tróficas, alterando la afinidad de PBR, aumentan su interacción con ACBP/DBI y que la acción conjunta de estas proteínas favorecen la entrada de colesterol a la membrana mitocondrial interna.

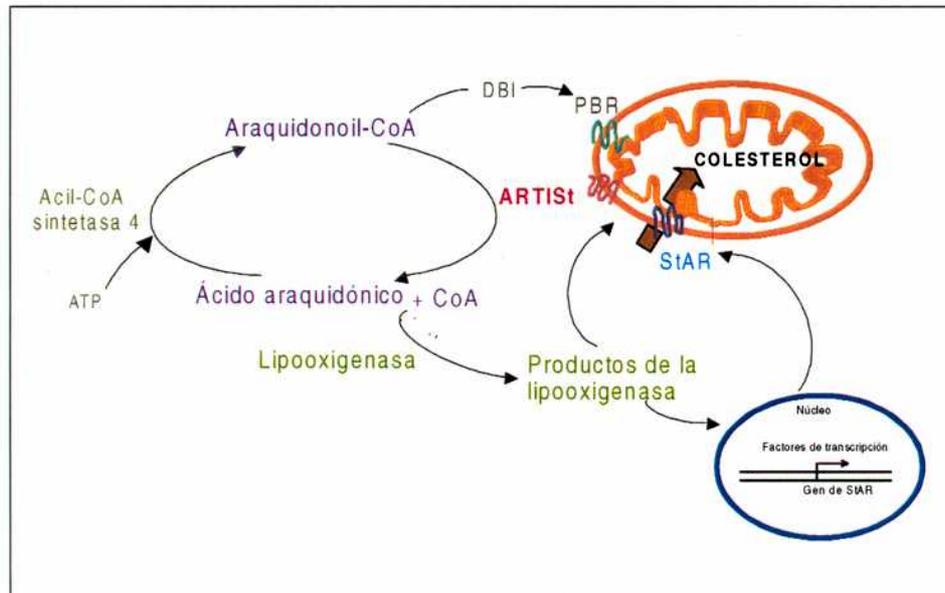
**I-6- Mecanismo propuesto para la proteína ARTIS<sub>t</sub> en tejidos esteroideogénicos.**

En la presente sección describiremos el mecanismo que se sugiere para la regulación del paso limitante de la esteroideogénesis, es decir el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la membrana mitocondrial interna. Como se ha mencionado anteriormente, en el mecanismo de regulación de la síntesis de esteroides intervienen diversas proteínas que se relacionan entre sí para conformar un proceso global que actualmente es tema de estudio de numerosos grupos de trabajo. En el esquema representado en la Figura 6 se detalla la interacción de ARTIS<sub>t</sub> con las proteínas descritas previamente que también están involucradas en la regulación de la esteroideogénesis, entre ellas: la proteína StAR, ACS4, ACBP/DBI y PBR.

Dado que la proteína ARTIS<sub>t</sub> interviene en la liberación de AA, y la proteína StAR requiere de AA y sus metabolitos de la vía de la lipooxigenasa, se ha propuesto que, luego de la activación hormonal, se produce un aumento en la concentración del segundo mensajero con la consiguiente activación de las proteín-quinasas y fosforilación de proteínas, con lo cual se produce la activación de ARTIS<sub>t</sub>, que actúa estimulando la liberación de AA para aumentar la transcripción y traducción de StAR.

Además de la relación postulada entre la proteína ARTIS<sub>t</sub> y StAR, la primera estaría también interactuando con otras proteínas con el objetivo de permitir la entrada del colesterol a la membrana interna de la mitocondria. La enzima ACS4 intervendría en la esterificación del AA libre para producir araquidonoil-CoA. De esa manera el araquidonoil-CoA podría ser transportado al sitio de acción de la acil-CoA tioesterasa para luego liberar AA en el compartimiento específico de la célula. Por otra parte, el PBR estaría a su vez

modulado por los niveles de ACBP/DBI circulantes. En conclusión, hemos sugerido que los niveles de AA libre intracelular podrían ser modulados por la acción concertada de la acil-CoA tioesterasa y la acil-CoA sintetasa. La acción de ambas enzimas podría también ser de importancia para confinar el AA liberado en un compartimiento subcelular específico.



**FIGURA 5:** MECANISMO DE ACCIÓN DE ARTIST EN TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS.

En el gráfico se esquematiza el mecanismo sugerido para la entrada del colesterol a la membrana interna de la mitocondria, paso limitante en la esteroidogénesis. En él se muestra el papel que desempeña ARTIST como la proteína reguladora de los niveles intracelulares de AA, un evento que es imprescindible para que el proceso de la esteroidogénesis tenga lugar.

Referencias: ARTIST: Arachidonic acid-Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis, StAR: Steroidogenic Acute Regulator, PBR: Receptor Periférico de Benzodiazepinas, DBI: Diazepam Binding Inhibitor.

## **II- LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN TEJIDOS NO ESTEROIDOGÉNICOS**

El rol propuesto para ARTIS<sub>t</sub> en tejidos esteroideogénicos como liberador de AA durante la estimulación hormonal fue ampliamente detallado en la sección anterior. Sin embargo cabe destacar que, en trabajos preliminares, se detectó la presencia de ARTIS<sub>t</sub>, no sólo en tejidos esteroideogénicos, sino también en otros tejidos.

Entre ellos, se encontró una alta expresión de la proteína en corazón, un tejido no esteroideogénico (Finkielstein y col, 1996). Esto llevó a pensar en un rol más amplio de la proteína ARTIS<sub>t</sub> en el mecanismo de transducción de señales. Dada la importancia del AA como sus metabolitos en el tejido cardíaco, en el presente trabajo nos propusimos investigar la posibilidad que ARTIS<sub>t</sub> también pueda ser regulado hormonalmente en corazón y que este mecanismo de regulación de los niveles de AA intracelular no sea exclusivo de los tejidos esteroideogénicos.

Para una mejor comprensión del tema, en las siguientes secciones se describirá brevemente la función y regulación del tejido cardíaco, como así también la importancia del AA y sus metabolitos en dicho tejido.

### **II-1- Función y regulación del tejido cardíaco.**

#### **II-1- a- Importancia de la función cardíaca.**

La función primordial del sistema cardiovascular es la distribución y recolección de la sangre de todo el organismo. Para poder cumplir con dicha función, debe mantener la presión sanguínea y el caudal de sangre necesarios para la adecuada perfusión de los diversos órganos y tejidos. Tanto la presión

como el caudal son controlados por complejos mecanismos que responden a los requerimientos metabólicos de diferentes partes del cuerpo y a sus interrelaciones funcionales.

El sistema nervioso central regula el automatismo cardíaco del corazón, las fibras simpáticas ejercen un control estimulador y afectan sus propiedades en sentido positivo, mientras que las fibras parasimpáticas inhiben la función cardíaca y afectan a estas propiedades en sentido negativo (Best y Taylor, 1981). En reposo, los nervios vagos ejercen una continua limitación sobre la acción del corazón.

El corazón es un órgano sujeto a múltiples estímulos que se transducen por distintos mecanismos moleculares; los mediadores químicos posganglionares actúan sobre sitios receptores específicos de las células efectoras. Es el caso de la noradrenalina y la acetilcolina que se unen a receptores adrenérgicos (simpáticos) y colinérgicos (parasimpáticos) respectivamente. Ante diversos estímulos, entre ellos actividad física, tensión psicológica, pérdidas de sangre u otros estímulos fisiológicos o relacionados con estados de enfermedad hay activación del sistema nervioso simpático. Además, el corazón es blanco de otros compuestos, entre ellos el glucagón, las hormonas de la corteza suprarrenal, la angiotensina, la serotonina, la tiroxina y la bradiquinina.

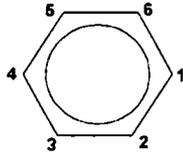
### **II-1- b- Estructura y función de las catecolaminas.**

Las catecolaminas, secretadas por el sistema nervioso simpático y la médula suprarrenal, participan en la regulación de diversas funciones, en particular para integrar las reacciones a diversos tipos de stress, que de otra manera pondrían en peligro los mecanismos homeostáticos.

Las catecolaminas, sean liberadas por la médula suprarrenal o por terminaciones nerviosas posganglionares adrenérgicas, ejercen, entre otros, efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos sobre el miocardio. Esto significa que se produce tanto un aumento en la fuerza de la contracción como de la frecuencia cardíaca.

Muchas de las acciones de los agonistas y antagonistas que activan o inhiben a los receptores adrenérgicos se pueden comprender en términos de los efectos fisiológicos conocidos de las catecolaminas. Además de las catecolaminas endógenas, como adrenalina o noradrenalina, existen análogos estructurales sintéticos que tienen especificidad por subtipos particulares de receptores adrenérgicos. En 1910, Barger y Dale estudiaron la actividad farmacológica de una gran serie de aminas sintéticas relacionadas con la adrenalina y por su acción, las denominaron simpaticomiméticas (Barger y Dale, 1910).

En la Figura 6 se muestran las estructuras de las catecolaminas. Como se observa, éstos poseen un anillo benceno con una cadena hidrocarbonada en la posición 1 que contiene un grupo amino. Además de la cadena hidrocarbonada, los compuestos: noradrenalina, adrenalina, isoproterenol, dopamina y otros tienen hidroxilos sustitutivos en las posiciones 3 y 4 del anillo benceno. Las aminas simpaticomiméticas con estas sustituciones hidroxílicas en el anillo aromático son denominadas catecolaminas. Como se explicará seguidamente, éstas se unen a los receptores específicos con diferente afinidad. Entre los diversos fármacos las tasas de actividad varían desde actividad  $\alpha$ -predominante (fenilefrina) hasta actividad  $\beta$ -predominante (isoproterenol).

		CH	CH	NH
				
ADRENALINA	3-OH, 4-OH	OH	H	CH <sub>3</sub>
NORADRENALINA	3-OH, 4-OH	OH	H	H
DOPAMINA	3-OH, 4-OH	H	H	H
ISOPROTERENOL	3-OH, 4-OH	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
FENILEFRINA	3-OH	OH	H	CH <sub>3</sub>

**FIGURA 6:** ESTRUCTURA DE LAS CATECOLAMINAS.

La adrenalina es el producto primario de la secreción hormonal de la médula suprarrenal en el mamífero, en tanto que la noradrenalina es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso simpático periférico. La única diferencia estructural que existe entre ambos es el sustituyente metilo en el grupo amino.

La adrenalina es un estimulante poderoso de los receptores tanto  $\alpha$  como  $\beta$ -adrenérgicos, por lo cual sus efectos en los órganos blanco es complejo. Tiene acción directa en los receptores  $\beta_1$  predominantes del miocardio y los tejidos de conducción. En el corazón se encuentran también receptores  $\alpha$  y  $\beta_2$ , pero existen diferencias considerables entre las especies. Aumenta la frecuencia cardíaca y aumenta el trabajo del corazón y su consumo de oxígeno.

La noradrenalina es el mediador químico liberado por los nervios adrenérgicos posganglionares de los mamíferos. Con la administración de noradrenalina se incrementan las presiones sistólicas y diastólicas y se eleva la resistencia periférica total, lo que reduce el flujo sanguíneo hacia riñón, hígado y músculo estriado. La adrenalina y noradrenalina son equipotentes para estimular

a los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos.

El isoproterenol es un agonista  $\beta$ -adrenérgico sintético. A nivel farmacológico, la administración de soluciones intravenosas del isoproterenol disminuye la resistencia vascular periférica, disminuye la presión arterial media y aumenta el gasto cardíaco a causa de los efectos cronotrópico e inotrópico positivos. Desde el punto de vista metabólico, es similar a la adrenalina ya que estimula la liberación de ácidos grasos (Goodman y Gilman, 1996).

En cambio, la fenilefrina es un agonista  $\alpha$ -adrenérgico selectivo. Sus efectos son semejantes a los del agonista metoxamina. La reacción principal cardiovascular es el incremento de la presión arterial, que se acompaña de bradicardia sinusal a causa de la activación de los reflejos vagales. También produce vasoconstricción arterial (Goodman y Gilman, 1996).

### **II-1- c- Clasificación de los receptores adrenérgicos.**

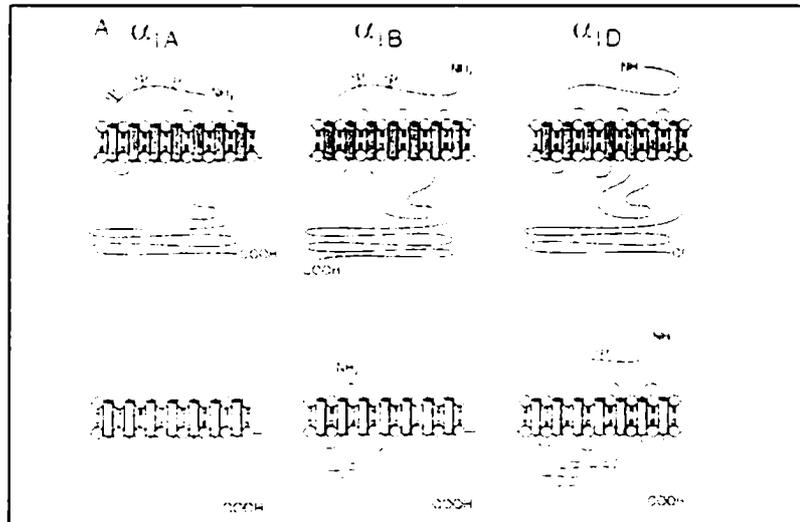
Para comprender los efectos tan diversos de las catecolaminas y los agentes simpaticomiméticos relacionados, es necesario conocer las propiedades de los diferentes tipos de receptores adrenérgicos. La identificación de las características de estos receptores y de las vías bioquímicas y fisiológicas que regulan, ha incrementado el conocimiento sobre los efectos al parecer contradictorios y variables de las catecolaminas sobre los diversos sistemas orgánicos. En base a las propiedades de los diferentes tipos de receptores se ha determinado una clasificación que se detallará a continuación.

Los receptores adrenérgicos constituyen una familia de proteínas sumamente relacionadas. Las reacciones que ocurren después de la activación de todos los tipos de receptores adrenérgicos parecen resultado de los efectos

mediados por la proteína G sobre la generación de segundos mensajeros y sobre la actividad de los canales de iones.

En 1948, Ahlquist postuló por primera vez la existencia de más de un receptor adrenérgico. Esta hipótesis fue basada en estudios sobre la capacidad de la adrenalina, noradrenalina y otros agonistas relacionados para regular los diferentes procesos fisiológicos. Ahlquist propuso las designaciones de  $\alpha$  y  $\beta$  para los receptores ubicados sobre el músculo liso, en el cual las catecolaminas producen reacciones excitadoras e inhibitoras respectivamente (Ahlquist, 1948). De acuerdo al orden relativo de fijación de las catecolaminas a los receptores, se estableció un orden de potencia de los diversos agonistas para los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol > adrenalina > noradrenalina) y para los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (adrenalina > noradrenalina >> isoproterenol ).

En la actualidad se han descrito varios subtipos de receptores dentro de esta clasificación. Entre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se distinguen principalmente los  $\alpha_1$  (excitatorios posinápticos) y  $\alpha_2$  (presinápticos) (Langer y Lehmann, 1988). Se han clonado y definido desde el punto de vista farmacológico tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  (A,B,D) y se ha demostrado diferencias en la distribución tisular entre los subtipos. También se han hallado hasta el presente tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  (A,B,C) (Figura 7).



**FIGURA 7:** ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES  $\alpha$ -ADENÉRGICOS (Fuente: Goodman y Gilman, 1996).

En el corazón predomina fundamentalmente el receptor  $\alpha_{1A}$  (Bylund y col, 1992). La estimulación de estos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos da por resultado la regulación de varios sistemas efectores (Goodman y Gilman, 1996):

a) El modo primario de transducción de señales consiste en la movilización del  $Ca^{++}$  intracelular desde los sitios endoplásmicos de almacenamiento. La hidrólisis de polifosfoinosítidos fijados a la membrana por vía de la fosfolipasa C da por resultado la generación de dos segundos mensajeros: diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato. El inositol-1,4,5-trifosfato estimula la descarga del  $Ca^{++}$  desde las reservas intracelulares por medio de un proceso específico mediado por receptores, en tanto que el diacilglicerol es un potente activador de la proteína-quinasa C (Berridge, 1993).

b) La estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica de la fosfolipasa  $A_2$  produce la liberación de araquidonato libre, que a continuación se desplaza por las vías de

la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa para producir prostaglandinas y leucotrienos con bioactividad, respectivamente.

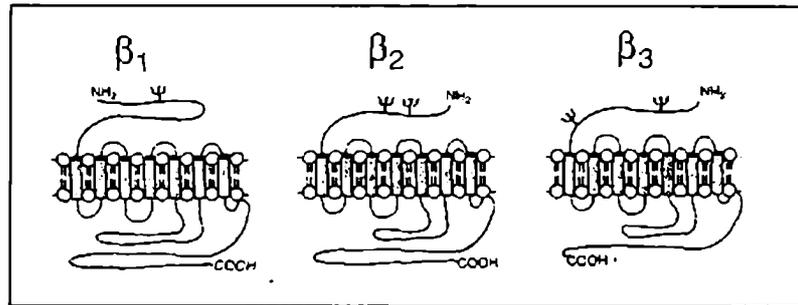
c) La fosfolipasa D hidroliza la fosfatidilcolina para producir ácido fosfatídico. Éste puede actuar por sí mismo como segundo mensajero y descargar  $Ca^{++}$  desde las reservas intracelulares o metabolizarse hasta el segundo mensajero diacilglicerol.

Entre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, se conocen los subtipos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Los tres receptores  $\beta$ -adrenérgicos comparten una identidad de secuencia de aminoácidos cercana al 60% (Figura 8). Todos los receptores  $\beta$ -adrenérgicos estimulan a la adenilil ciclase por interacción con Gs (Taussig y Gilman, 1995).

La estimulación del receptor produce acumulación de AMPc, activación de la proteína-quinasa dependiente de AMPc y un cambio en la función de gran número de proteínas celulares, como resultado de su fosforilación. Por añadidura, Gs puede intensificar directamente la activación de los canales de  $Ca^{++}$  sensibles al voltaje en la membrana plasmática de los músculos estriado y cardíaco (Brown y Birnbaumer, 1988). Esta acción puede ofrecer un medio adicional para regular la función de estos tejidos.

Los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos son los predominantes en los cardiomiocitos ventriculares de mamífero, por ejemplo, en rata, aproximadamente el 80% pertenece a este subtipo (Kuznetzov, 1995). También se ha encontrado el subtipos  $\beta_2$ , que si bien representa un componente menor en la respuesta contráctil del miocardio en condiciones fisiológicas, cobra un papel importante en ciertos procesos patológicos y de envejecimiento (Bristow y col, 1989). También se han descrito los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos, pero en

contraste con los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  han sido implicados como inhibidores de la función contráctil (Berlan y col, 1995; Kitamura y col, 2000).



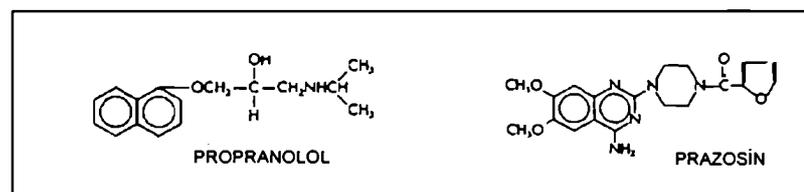
**FIGURA 8:** ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES  $\beta$ -ADRENÉRGICOS (Fuente: Goodman y Gilman, 1996).

#### II-1- d- Antagonistas de los receptores adrenérgicos.

Los antagonistas de los receptores adrenérgicos inhiben la interacción de las aminas simpaticomiméticas con sus receptores. Casi todos estos compuestos son antagonistas competitivos en sus interacciones con los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos. Por ejemplo, los antagonistas selectivos de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos inhiben la mayor parte de las acciones de la adrenalina y noradrenalina en corazón.

El antagonista propranolol (Figura 9) es un antagonista  $\beta$ -adrenérgico competitivo desprovisto de actividad agonista, tiene gran afinidad por los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos disminuyen la frecuencia cardíaca y la contractilidad miocárdica. También modifican el metabolismo de carbohidratos y lípidos y pueden atenuar la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo (Goodman y Gilman, 1996).

Dentro de los antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, el prazosín (Figura 9) es el prototipo de una familia de fármacos que contienen un núcleo piperazini-quinazolina, y se emplea para tratar la hipertensión. Es mucho más potente para bloquear los receptores  $\alpha_1$  que los  $\alpha_2$ . Los efectos más importantes se observan en el aparato cardiovascular, donde se inhibe la vasoconstricción inducida por las catecolaminas, lo que da como resultado una disminución de la presión arterial a causa de disminución de la resistencia periférica (Goodman y Gilman, 1996).



**FIGURA 9:** ESTRUCTURA DE ANTAGONISTAS  $\alpha$ - Y  $\beta$ -ADRENÉRGICOS.

## **II-2- Funciones del AA en tejido cardíaco.**

Dado que nuestro interés reside en estudiar la regulación de la activación de ARTIST en un tejido no esteroideogénico como lo es el tejido cardíaco, en la presente sección se detallará el rol que cumple el AA en corazón.

El AA es un compuesto que cumple numerosas funciones en el organismo, su metabolismo es rápido y se convierte en otros derivados que juegan papeles importantes en las respuestas fisiológicas. Ente las múltiples funciones del AA en corazón, está descrita la importancia fisiológica de sus metabolitos en respuesta a distintos estímulos.

La administración de catecolaminas promueve la síntesis de prostaglandinas que actúan como moduladores fisiológicos de la transmisión adrenérgica en varios tejidos, incluyendo al corazón (Malik y Sehic, 1990). El mayor prostanoides producido en respuesta a la estimulación de los nervios simpáticos o a la noradrenalina en corazón es la prostaglandina  $I_2$  (Khan y Malik, 1982; Shaffer y Malik, 1982). Ésta actúa como un agente cardioprotector produciendo vasodilatación coronaria (Dusting y col, 1978), disminuyendo la liberación de norepinefrina de las fibras simpáticas y atenuando la contractilidad del miocardio por la noradrenalina (Lanier y Malik, 1985).

Las prostaglandinas pueden tener efectos vasodilatadores o vasoconstrictores de acuerdo al tipo y a la concentración intracelular. En casi todas las especies, las prostaglandinas de tipo E son vasodilatadoras potentes. Por lo general, la presión arterial disminuye en reacción a las prostaglandinas  $I_2$  y E, con lo que aumenta la corriente sanguínea en casi todos los órganos, incluidos corazón y riñón. En cambio la presión arterial aumenta por acción de la prostaglandina  $F_2\alpha$ . Además, las prostaglandinas de las series E y F por lo común incrementan el gasto cardíaco. Con respecto a otros metabolitos del AA, el tromboxano  $A_2$  es un vasoconstrictor potente, mientras que los leucotrienos en general ocasionan hipotensión.

Se ha observado que en conejos, la síntesis de prostaglandinas cardíacas producidas por estímulo adrenérgico está vinculado a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Shaffer y Malik, 1982). Ruan y colaboradores describieron que en miocitos ventriculares de conejo, el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol aumentaba la síntesis de la prostaglandina  $I_2$ , que era inhibida por propranolol y no por prazosín (Ruan y col, 1996-a,b).

El AA y los productos de su metabolismo tienen una gran variedad de

efectos en los canales iónicos en diferentes tejidos (Needleman y col, 1994). En el tejido cardíaco el AA causa el desacoplamiento de las células al cerrar la unión en hendidura de los canales (Massey y col, 1992). En las células del atrio, el AA y sus metabolitos modulan los canales de  $K^+$  (Kim y col, 1989). El AA puede tener un efecto modulador en los canales de  $Ca^{++}$  de las células del atrio y ventriculares (Huang y col, 1992).

También se ha descrito la presencia de la actividad 12- y 15-lipooxigenasa en músculo cardíaco y cardiomiocitos en cultivo de rata (Breitbart y col, 1996; Wallukat y col, 1994). Por otra parte, también se ha reportado una  $P_{450}$ -epoxigenasa responsable de la formación de epóxidos a partir de AA en corazón (McGiff, 1991). Estos productos han demostrado afectar el tono vascular y pueden tener roles importantes en el desarrollo de ciertas enfermedades, por ejemplo exacerbar la respuesta a la isquemia y reperfusión en corazones aislados en cobayos (Moffat y col, 1993).

En cuanto a los sistemas enzimáticos involucrados en la liberación de AA, se ha descrito la existencia de varias fosfolipasas  $A_2$  en tejido cardíaco, tanto citosólicas como particuladas, tanto dependientes como independientes de  $Ca^{++}$  (McHowat y Creer, 1998). También se ha estudiado su activación por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (De Windt y col, 1997; Debetto y col, 1999), receptores muscarínicos (Kim y col, 1989), bradiquinina (Nakamura y col, 1996), interleuquina-1 $\beta$  (McHowat y Liu, 1997), vitamina E (Tran y col, 1996-1997), ésteres de forbol (Church y col, 1993) y angiotensina II (Schorr, 1993), entre otros.

Sin embargo, si bien se conoce que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica incrementa la liberación de AA, al presente no se ha encontrado el sistema que está involucrado en esta liberación. Dada la presencia de ARTIST en tejidos

cardíaco, la importancia fisiológica del AA y sus metabolitos y el hecho que aún no se ha elucidado el mecanismo de liberación de AA por estimulación  $\beta$ -adrenérgica, nos hemos propuesto estudiar si existe un sistema diferente al descrito hasta ahora en la liberación de AA por estimulación  $\beta$ -adrenérgica en tejido cardíaco.

## **OBJETIVOS**

La proteína ARTIST es miembro de una nueva familia de tioesterasas recientemente caracterizada que interviene en la hidrólisis de acil-CoAs de cadena larga. Esta acil-CoA tioesterasa está presente tanto en tejidos esteroideogénicos como no esteroideogénicos. Se ha comprobado que en tejidos esteroideogénicos la actividad de ARTIST está regulada hormonalmente, representando una vía alternativa a la fosfolipasa A<sub>2</sub> en la liberación de AA.

La presencia de ARTIST en tejidos no esteroideogénicos amplía el panorama en cuanto al rol de esta proteína, ya que este hecho sugiere que la proteína podría tener un papel no solamente circunscripto a la estimulación de la esteroideogénesis, sino que también podría estar involucrada en distintos mecanismos de transducción de señales. Se ha elegido como modelo de estudio el tejido cardíaco. La razón de esta elección obedece a que si bien se conoce la importancia fisiológica del AA y sus metabolitos en este tejido, aún no se han elucidado completamente los mecanismos de activación de la liberación del AA.

En resumen, el conjunto de todas las evidencias señaladas en la Introducción nos llevó a proponernos como objetivo del presente trabajo de Tesis estudiar si ARTIST presenta actividad en tejido cardíaco y de ser así, investigar los mecanismos de activación de la misma.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **I- REACTIVOS UTILIZADOS**

Las siguientes drogas fueron adquiridas a Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA: Tris-hidroximetilamino metano (TRIS), dodecil - sulfato de sodio (SDS), albúmina de suero bovino (BSA), actinomicina D, isoproterenol, propranolol, ácido nordihidroguayarático (NDGA), inhibidor de protein-quinasa A, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina, 5-bromo-cloro-3-indolilfosfato, azul de nitro-tetrazolio, Ponceau S.

Dexametasona (9-fluor-11  $\beta$ ,17,21-trihidroxi-16  $\alpha$ -metilpregna-1,4 dieno-3,20 diona), Metopirona (2-metil-1,2-di-3-piridil-1-propanona) y Ba 40.028 (Sulfato de 1-( $\beta$ -guanidinoetil)-3-(4-piridil)-indol) fueron generosamente donados por Novartis, Basilea, Suiza.

Los reactivos utilizados para preparar las soluciones para electroforesis fueron provistos por Bio Rad Laboratories, CA, USA. El anticuerpo anti-progesterona fue comprado a Radioassay System Laboratories Inc., Carson, CA, USA. Las películas fotográficas X-Omat AR, reveladores y fijadores fueron de Eastman Kodak Company, NY, USA. Para la extracción de ARN se utilizó Trizol<sup>TM</sup> de GIBCO BRL, Life Technologies Inc.

Todos los demás reactivos utilizados fueron productos comerciales del más alto grado de pureza disponible.

## **II-ANIMALES**

### **II-1- Animales utilizados.**

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar (200-300 g) mantenidas en un régimen de luz diaria de 14 horas (07.00hs a 21.00 hs) en ambiente climatizado ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). La alimentación consistió en alimento balanceado (Purina) y agua administrados *ad libitum*.

### **II-2- Tratamiento y sacrificio de los animales.**

En los experimentos de perfusión del tejido cardíaco, los animales fueron anestesiados con éter y recibieron una inyección de heparina. Se abrió el tórax, el corazón fue removido y se colocó en un recipiente sumergido en hielo conteniendo una solución amortiguadora Krebs-Henseleit (KHB) cuya composición es: 114 mM NaCl; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 4,7 mM KCl; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 5,5 mM glucosa, equilibrado con 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ .

En los experimentos en los que se utilizó la glándula adrenal para separar las fracciones subcelulares controles, a los animales se les suministró dexametasona en el agua de bebida durante toda la noche (10  $\mu\text{g/ml}$ ), con el fin de minimizar la producción de esteroides que genera el estrés de la matanza. La composición de la solución administrada consistió en: dexametasona, 5 mg; ClNa, 45 mg; Metocell (hidroxi-propil-metil-celulosa), 50 mg en 500 ml de agua destilada. En estos casos las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se extrajeron las glándulas adrenales y se colocaron en recipientes sumergidos en hielo conteniendo una solución de manitol 270 mM, Tris-HCl 10 mM; pH 7,4 (solución A).

### **III- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARTIST EN GLÁNDULA ADRENAL**

#### **III-1- Fraccionamiento subcelular de la zona fasciculata-reticular.**

Una vez sacrificados los animales, las adrenales fueron inmediatamente disecadas, liberadas del tejido graso circundante, colocadas en recipientes sumergidos en hielo y decapsuladas para remover la zona glomerulosa. Las glándulas decapsuladas fueron cuarteadas y homogeneizadas en la solución A, en un volumen de 0,2 ml por cada adrenal homogeneizada, empleando un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflon.

El homogenato fue centrifugado a 800xg durante 10 minutos. Mediante este procedimiento se obtuvo el sedimento - que corresponde a la fracción nuclear - y el sobrenadante. El sedimento se lavó y se resuspendió en solución A en la proporción de 0,2 ml por adrenal. El sobrenadante se centrifugó a 9000xg, durante 20 minutos y el sedimento - que contiene a la fracción mitocondrial - se lavó y se resuspendió en solución A en la misma proporción.

El sobrenadante se centrifugó a 105.000xg durante una hora y se obtuvieron dos fracciones: el sobrenadante, que representa la fracción citosólica y el sedimento, constituido por la fracción microsomal. Este último se resuspendió en solución A en una relación de 0,1 ml por adrenal.

### **III-2- Medición de la bioactividad de ARTIS<sub>t</sub> en adrenal.**

#### **III-2- a- Ensayo homólogo de recombinación de fracciones subcelulares para evaluar la capacidad estimuladora de ARTIS<sub>t</sub>.**

La determinación de la actividad biológica de ARTIS<sub>t</sub> en adrenal se realizó mediante el ensayo descrito por Neher y col (Neher y col, 1982). Este ensayo consiste en evaluar la neosíntesis mitocondrial de esteroides en un sistema *in vitro* constituido por la recombinación de fracciones subcelulares.

La detección de factores esteroidogénicos ACTH dependientes en la fracción citosólica se realizaron incubando las fracciones mitocondrial, nuclear y microsomal obtenidas de adrenales controles, junto con la fracción citosólica obtenida de adrenales de animales estimulados hormonalmente. Los esteroides presentes en el medio de incubación se cuantificaron por radioinmunoensayo. Esta determinación permitió evaluar la capacidad esteroidogénica de la muestra ensayada.

Con respecto al esteroide a cuantificar, se empleó la determinación de progesterona. Se prefirió dosar este metabolito antes que pregnenolona por varias razones. En primer lugar el radioinmunoensayo para pregnenolona es menos específico debido a que no se puede excluir una reacción cruzada del anticuerpo con ésteres lipofílicos de pregnenolona en el tejido adrenal. Por otra parte, para medir la neosíntesis de pregnenolona, se deben utilizar inhibidores apropiados de la metabolización del esteroide. Para inhibir la conversión de pregnenolona a progesterona se utiliza cianocetona en concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ M. Esta resulta una concentración muy alta, ya que se describió que afecta la actividad del citocromo P450<sub>csc</sub> (Kahnt y col, 1974).

### **III-2- b- Incubación de las fracciones subcelulares.**

Las incubaciones para medir la actividad esteroideogénica se realizaron en viales de vidrio donde se colocaron las distintas fracciones subcelulares, equivalentes a media adrenal y los inhibidores de hidroxilación: metopirona y Ba 40 028. El primero actúa inhibiendo la 21-hidroxilasa y el segundo las 11  $\beta$ -, 18- y 19-hidroxilasas. En estas condiciones, el esteroide mayoritario es la progesterona.

La fracción citosólica obtenida de adrenales activadas o controles se colocó junto con la fracción microsomal y nuclear provenientes de adrenales controles y cantidad suficiente de solución A como para completar un volumen de 250  $\mu$ l. Los inhibidores de la metabolización de progesterona fueron agregados en un volumen de 350  $\mu$ l de una solución preparada con un volumen de Tris-HCl 0,15 M pH 7,4; 2 volúmenes de solución A; 1 volumen de KCl 0,3 M y 1 volumen de  $MgCl_2$  0,02 M. Las concentraciones de metopirona y Ba 40 028 fueron 0,27 mM y 1,6 mM respectivamente en la mezcla de incubación final.

La mezcla fue completada a un volumen final de 700  $\mu$ l con el agregado de 100  $\mu$ l de la fracción mitocondrial obtenida de adrenales no estimuladas o solución A y seguidamente incubada a 37°C con agitación durante 9 minutos. Al final de este período, se inhibió la síntesis de esteroides mitocondriales colocando los tubos de incubación en un baño de agua-hielo y agregando a cada uno de ellos 2 ml de una solución acuosa de metanol 50% v/v.

### **III-2- c- Determinación de progesterona.**

La progesterona presente en el medio de incubación fue medida por radioinmunoensayo. Para ello, se realizó previamente una extracción de los

esteroides en un solvente orgánico. Se agregaron 1,5 ml de ciclohexano a cada vial de incubación. Luego de agitar vigorosamente la mezcla, ésta se centrifugó durante 5 minutos a 800xg, para separar la fase orgánica de la acuosa. La fase orgánica se utilizó para determinación de progesterona. Mediante el agregado de progesterona tritiado al medio de incubación, se ha demostrado que este procedimiento permite extraer más del 90% del esteroide.

Luego una alícuota de 10 a 50  $\mu$ l de la fase orgánica superior fue transferida a un tubo de vidrio. Todos los volúmenes fueron igualados con ciclohexano y las muestras fueron evaporadas. En todos los tubos se utilizó el mismo volumen. Paralelamente se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de progesterona, las que también fueron llevadas al mismo volumen que las muestras y evaporadas simultáneamente.

Luego de la evaporación, las muestras fueron resuspendidas en solución fosfosalina (PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), agitadas en vortex durante 30 segundos y colocadas en un baño a 37°C durante dos horas y agitadas nuevamente. Esta solución se incubó toda la noche a 4°C con 100  $\mu$ l de progesterona radioactiva (10.000 dpm) y 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-progesterona en una dilución 1:42.000 en PBS-BSA 0.1%.

Al cabo de este período los tubos fueron enfriados en agua-hielo y la hormona libre separada de la unida al anticuerpo mediante la incubación con 200  $\mu$ l de carbón activado 0,625% p/v durante 7 minutos a 4°C y posterior centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos rápidamente a viales de conteo a los cuales se les agregó 0,5 ml de dioxano y 2,5 ml de mezcla centelladora Omnifluor para realizar las mediciones en un contador  $\beta$  de centelleo líquido.

**III-2- d- Cálculo de la producción neta de progesterona en el bioensayo.**

Para evaluar la producción mitocondrial neta de progesterona causada por efecto estimulador de los citosoles activados debe tenerse en cuenta el contenido de progesterona endógeno de todas las fracciones. Con el fin de cuantificar estos aportes, se incubó:

- ◆ A) El sistema completo:  
(fracción activada + fracción microsomal + fracción nuclear + mitocondrias)
- ◆ B) La fracción activada por estímulo hormonal junto con la fracción microsomal y nuclear:  
(fracción activada + fracción microsomal + fracción nuclear)
- ◆ C) Las mitocondrias sin agregado de las otras fracciones:  
(mitocondrias)

Para calcular la producción mitocondrial neta de progesterona, es decir la que se sintetiza durante el ensayo, se sustrajo al valor del sistema A, la suma de la progesterona producida por los sistemas B y C. De modo que:

Progesterona neta = Progesterona producida en A – Progesterona producida en B - Progesterona producida en C.

## **IV- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARTIST EN TEJIDO CARDÍACO**

### **IV-1- Aislamiento y perfusión de corazón.**

Como ya se ha señalado, el corazón de los animales fue removido y colocado en solución KHB con la finalidad de perfundirlo con agonistas o antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos. La perfusión de los corazones se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, del Hospital de Clínicas de Buenos Aires, siguiendo un protocolo descrito por Poderoso y col de acuerdo a la técnica de Langendorff (Poderoso y col, 1995).

Los corazones fueron perfundidos por la aorta utilizando un sistema de perfusión de órganos universal (Harvard Apparatus, Millis, MA, USA). El flujo de perfusión se mantuvo constante a 8 ml/minuto utilizando una bomba peristáltica (Harvard Apparatus) y el corazón se mantuvo a 37°C por medio de un baño de agua que rodeaba el reservorio (Techne, Cambridge, UK). Luego de equilibrar los órganos con solución KHB durante 15 minutos, los corazones fueron perfundidos con distintas concentraciones del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol, según se indica en cada caso en particular. En los experimentos de bloqueo del estímulo adrenérgico, se perfundieron los corazones con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol en una concentración  $10^{-5}$ M durante 15 minutos previo a la estimulación con isoproterenol.

### **IV-2- Fraccionamiento subcelular.**

Todos los pasos que se detallan sobre el fraccionamiento subcelular fueron realizados a 4°C. Luego de la perfusión, se removió el pericardio y los corazones fueron pesados y luego cortados con tijeras y lavados con solución A.

Luego los corazones fueron transferidos a un homogeneizador Ultraturax y homogeneizados en 5 ml de solución A por gramo de tejido.

El procedimiento seguido a continuación para separar las fracciones subcelulares fue semejante al anteriormente descrito para zona fasciculata de adrenal. El homogenato fue centrifugado a 800xg por 10 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 9.000xg 20 minutos, con lo cual se obtuvo la fracción mitocondrial y el sobrenadante post-mitocondrial. Éste fue centrifugado a 105.000xg durante una hora para obtener el citosol y la fracción microsomal.

#### **IV-3- Ensayo de recombinación de fracciones subcelulares heterólogas *in vitro*.**

Para estudiar la bioactividad de ARTIS<sub>t</sub> en adrenal hemos descrito un ensayo en el cual se evaluó la neosíntesis mitocondrial de esteroides en un sistema *in vitro* constituido por la recombinación de fracciones subcelulares de adrenal.

De manera similar, para evaluar la actividad de ARTIS<sub>t</sub> cardíaca se puso a punto un ensayo en el cual se enfrentaron extractos provenientes de corazones estimulados, con microsomas, mitocondrias y núcleos de adrenales controles. De esta manera se midió la capacidad de los extractos de producir factores activados que estimularan la síntesis de esteroides *in vitro*. En este caso se trata de una recombinación heteróloga, ya que los citosoles provienen de corazones perfundidos con diversos agonistas y antagonistas adrenérgicos (Neuman y col, 1999).

Brevemente, una alícuota de citosol cardíaco (0,10 ml) fue recombinado con la fracción mitocondrial, microsomal y nuclear de adrenal en un volumen final

de 0,70 ml en la presencia de 0,27 mM de metopirona y 1,6 mM Ba 40.028 como inhibidores del metabolismo de la progesterona. La mezcla fue incubada por 9 minutos a 37°C y la reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de agua-hielo y por adición de 2 ml de metanol / HCl 2,5 mM (1:1) / tubo.

Los esteroides sintetizados se extrajeron agregando 1,5 ml de ciclohexano al volumen total de incubación. Luego de agitar vigorosamente la mezcla, ésta se centrifugó durante 5 minutos a 800xg para separar las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica se utilizó para la determinación de progesterona por radioinmunoensayo de la misma manera que ha sido descrito previamente.

Para calcular el valor de progesterona producida durante el ensayo, al valor total de progesterona medida se le restó el contenido endógeno de progesterona de las mitocondrias, núcleos y microsomas de adrenal. En este caso el valor de progesterona del citosol no fue considerado, ya que el citosol cardíaco no posee progesterona.

#### **IV-4- Incubación de los citosoles cardíacos con anticuerpos antipéptidos.**

Se realizaron experimentos con el objetivo de estudiar la participación de ARTIST cardíaca en la respuesta observada en el ensayo de recombinación heterólogo. Los citosoles de los corazones perfundidos con isoproterenol  $10^{-7}$ M fueron incubados durante 16 horas a 4°C con los sueros conteniendo los anticuerpos contra péptidos de ARTIST o con suero normal de conejo, en una dilución final 1/100. Se midió la capacidad de dichos citosoles de activar la síntesis de progesterona en presencia de las fracciones subcelulares de adrenal antes mencionadas.

## **V- TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS**

### **V-1- Cuantificación de proteínas.**

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry (Lowry y col, 1951), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como standard.

### **V-2- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).**

El análisis de las muestras mediante SDS-PAGE en una dimensión fue realizado conforme al descripto por Laemmli (Laemmli, 1970).

#### **V-2- a- Armado de geles y electroforesis en una dimensión.**

Se armaron minigeles de 10 cm x 7 cm x 0,7 mm de espesor. Se cargaron con una mezcla de concentración final: 10% de acrilamida, 0,27% de bisacrilamida, en una solución Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 con SDS al 0,1%.

La solución de siembra contenía Tris-HCl 62 mM, pH 6,8; SDS al 2%; glicerol 20% y azul de bromofenol. La solución de corrida estaba compuesta por Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las corridas electroforéticas se desarrollaron a voltaje constante (100 V) durante 2 horas aproximadamente.

#### **V-2- b- Tinción de las proteínas.**

En los casos en que las proteínas de los geles de poliacrilamida no fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, éstas fueron teñidas

con Coomasie Brilliant Blue R 250 0,01% en solución acuosa conteniendo 10% de etanol y 15% de ácido acético. En estas situaciones, los geles fueron secados al vacío sobre papel de filtro.

### **V-3- Western blot.**

#### **V-3- a- Electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.**

Se empleó la técnica descrita por Towbin y col (Towbin y col, 1979). Al finalizar la electroforesis el gel fue lavado dos veces, durante 10 minutos con la solución de transferencia, compuesta por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% v/v. Seguidamente las proteínas fueron eléctricamente transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocelulosa I, de Gibco BRL, MD; USA). La transferencia se desarrolló a amperaje constante, 200 mA, durante dos horas.

La visualización de las proteínas transferidas se realizó sumergiendo la membrana en una solución de Ponceau S (0,2% de Ponceau S en ácido acético 1%). La evaluación del material no transferido fue realizada mediante tinción del gel luego de la transferencia con Coomasie-Blue.

#### **V-3- b- Reconocimiento de ARTIST por anticuerpos antipeptidos.**

Luego de transferir las proteínas a la membrana y con el fin de minimizar la unión inespecífica de los anticuerpos a la misma, ésta fue incubada con 5% de leche en polvo en PBS sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  conteniendo 0,5% de Tween (PBS-Tween). El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. A continuación las membranas fueron lavadas dos veces

con PBS-Tween, e incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos antipeptidos de ARTIST diluidos en el mismo medio.

Para la detección de los anticuerpos fijados a la membrana se empleó inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina. Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y azul de tetrazolio (Blake y col, 1984).

#### **V-4- Detección de ARTIST en tejidos esteroideogénicos y no esteroideogénicos.**

##### **V-4- a- Aislamiento y fraccionamiento subcelular de distintos órganos.**

Con el objetivo de estudiar la presencia de ARTIST en tejidos esteroideogénicos y no esteroideogénicos, se obtuvo el citosol de distintos órganos. Se extrajeron adrenales, hígado, riñón y corazón de rata. A las ratas macho se les extrajo también testículo y próstata; y a las ratas hembra los ovarios. En el caso de la glándula adrenal, ésta fue procesada en dos partes, por un lado la glomerulosa y por otro la zona fasciculata-reticular.

Los tejidos fueron homogeneizados en solución A manteniendo la relación 25 mg de tejido/ 200 µl de solución A. En el caso de hígado, riñón y corazón se utilizó un homogeneizador Ultraturax.

Se obtuvieron células de Leydig, provenientes de testículo de rata adulta. Una vez que los testículos fueron decapsulados, se incubaron en tubos de polietileno (Falcon) de 45 ml de capacidad conteniendo medio M199-albúmina de suero bovino (BSA) 0,1% y colagenasa (0,25 mg/ml). La incubación se realizó

durante 15 minutos a 37°C en un baño termostatzado con agitaci3n. La reacci3n se detuvo por el agregado de 40 ml de medio M199, se filtraron las c3lulas a trav3s de una gasa de nylon y se centrifugaron por 10 minutos a 120xg. El sedimento celular fue resuspendido en M199-BSA 0,5% hasta obtener una concentraci3n final de 10<sup>6</sup> c3lulas/ml.

Para obtener el citosol de los distintos 3rganos se procedi3 en forma an3loga a la descripta anteriormente: los n3cleos, restos de c3lulas y membranas celulares fueron precipitadas a 800xg durante 10 minutos, el sobrenadante se centrifug3 de 9.000xg durante 20 minutos y el sobrenadante correspondiente a la fracci3n post-mitocondrial fue ultracentrifugado a 105.000xg por una hora.

#### **V-4- b- Reconocimiento de ARTISt.**

Una vez aislado el citosol de los distintos 3rganos, se sembraron 10 µg de prote3na de cada uno de ellos en diferentes carriles de geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Luego de separadas las prote3nas, 3stas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y luego del bloqueo fueron incubadas con los anticuerpos antipeptidos de ARTISt en una diluci3n final de 1:500 en PBS sin Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup>. El revelado de las bandas espec3ficas se realiz3 de acuerdo a la t3cnica descripta anteriormente.

## **VI- TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DEL ARNm de ARTIST**

### **VI-1- Extracción de ARN.**

La extracción fue realizada utilizando una variación del método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se homogeneizó el tejido cardíaco y hepático en Trizol TM en una relación aproximada de 100 mg de tejido en 1 ml de Trizol TM usando un homogeneizador Ultraturax (Neuman y col, 2000).

El volumen de muestra no excedió el 10% del volumen de reactivo utilizado. El homogenato fue incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se adicionaron 0,2 ml de cloroformo y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos.

Luego de incubar 3 minutos a temperatura ambiente la suspensión fue centrifugada a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Como resultado de la centrifugación se separan dos fases; una fase inferior fenólica de color rojo y una fase superior acuosa incolora, donde se encuentra el ARN.

Se transfirió esta última fase a un tubo nuevo y se agregaron 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de reactivo de Trizol TM usado. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos a 4°C. El ARN se observó como un precipitado blanco gelatinoso en el fondo del tubo. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 75%, se secó y resuspendió en agua tratada con di-etil-pirocarbonato (DEPC).

La cuantificación del mismo fue llevada a cabo espectrofotométricamente con una dilución 1:100 de la muestra medida a 260 y 280 nm. Sólo aquellas preparaciones de ARN con una relación 260 / 280 mayor a 1,85 fueron utilizadas en los estudios de Northern blot.

#### **VI-2- Northern blot**

Cada una de las preparaciones de ARN (24 µg) se combinaron con 12,3 µl de formamida, 4,3 µl de formaldehído y la cantidad necesaria de solución 5x (Hepes 0,25 M pH 7,8; acetato de sodio 0,05 M pH 7; EDTA 0,05 M pH 8) para que el volumen final a sembrar en el gel sea de 27 µl.

Las muestras se incubaron a 65°C por 15 minutos antes de sembrarlas en geles de agarosa 1,2% y 2,2 M de formaldehído. La corrida de las mismas se realizó a 75 Volts por 4 horas a corriente constante en amortiguador de corrida 1x (125 ml de Hepes 0,5 M pH 7,8; 12,5 ml de Acetato de sodio 1 M pH 7,5; EDTA 0,25 M pH8). Luego de la corrida el gel se dejó lavando por 1 hora.

La transferencia del ARN a la membrana fue pasiva. Se realizó colocando el sobre un papel Whatmann saturado en la solución de transferencia 20xSSC (Na Cl 3M; citrato de Na 0,3M; pH 7) con un filtro de nylon Hybon-N (Amersham) sobre la parte superior, a su vez sobre el cual se apoyan dos o tres piezas de papel Whatmann y luego una pila de papel absorbente con un vidrio en la parte superior que la separa de un recipiente de plomo de aproximadamente 0,5 kg. de peso. Esta estructura de transferencia se mantuvo toda la noche.

Al día siguiente la membrana fue removida y horneada a 80°C por 2 horas para fijar el ARN. En estas condiciones la membrana puede ser conservada indefinidamente o directamente prehibridizada. Para ello, la misma

se incubó en 10 ml de solución de prehibridación (50% formamida, 1% SDS, 1xDenhardt, 5xSSC y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado).

La hibridación se realizó incubando la membrana a 42°C toda la noche en la solución de prehibridación a la cual se le agregó la sonda marcada y desnaturalizada en una concentración de 20 ng/ml. Los lavados de la membrana se realizaron en sucesivos pasos en los cuales se disminuyó la concentración salina y se aumentó la temperatura.

El proceso incluyó: a) 2xSSPE (CINa 0,36 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; EDTA 20 mM pH 7,4); SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente por 20 minutos, dos veces y b) 1xSSPE, SDS 0,1% (p/v) a 65°C por 30 minutos, dos veces. La membrana finalmente se lavó en 2xSSPE y se expuso con intensificador a -70°C.

Cada Northern blot fue hibridado con la sonda específica de ARTISt. Luego de revelada la autorradiografía correspondiente, la sonda fue removida de la membrana por sucesivas inmersiones de ésta en SDS al 0,1%, previamente calentado a ebullición.

### **VI-3- Cálculo de las intensidades relativas**

Las autorradiografías fueron cuantificadas usando un densitómetro láser Shimadzu. El tratamiento de remoción de las sondas anteriormente descrito permitió que las membranas pudieran ser rehibridadas con otras sondas, por ejemplo, con la sonda del 28S ribosomal, que se mantiene constante con los distintos tratamientos. De esta manera se compararon las intensidades relativas de cada banda en los carriles respectivos.

## **VII- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico de los resultados se realizó por computación, empleando el programa Graph PAD InStat 1990, versión 1,15. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  E.S (error standard). La significación estadística fue evaluada usando ANOVA seguida del test de Tukey. Se consideró significativo  $P < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

## **I- DISTRIBUCIÓN TISULAR Y SUBCELULAR DE ARTIS<sub>t</sub>.**

### **I-1- Consideraciones previas.**

En trabajos anteriores realizados en nuestro Laboratorio, la proteína ARTIS<sub>t</sub> fue purificada a homogeneidad y caracterizada a partir de citosol de zona fasciculata de adrenal de rata estimulada *in vivo* con ACTH (Paz y col, 1994). El protocolo seguido para purificar la proteína incluyó la combinación de diferentes cromatografías y un ensayo de recombinación de fracciones subcelulares *in vitro* (Neher y col, 1982) para el reconocimiento de las fracciones bioactivas.

Los productos obtenidos por digestión trípica de una alícuota de ARTIS<sub>t</sub> eluida de SDS-PAGE permitieron la microsecuenciación de algunos péptidos internos de la proteína y también del extremo amino terminal (Paz y col, 1994). Por inyección en conejos de los péptidos sintetizados químicamente, se obtuvieron anticuerpos antipéptidos, algunos de los cuales fueron capaces de reconocer a la proteína ARTIS<sub>t</sub> de adrenal en forma desnaturalizada en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones (Paz y col, 1994; Finkielstein y col, 1996).

### **I-2- Detección de ARTIS<sub>t</sub> en diversos tejidos.**

En tejido adrenal, la estimulación con ACTH promueve la activación de ARTIS<sub>t</sub> por mecanismos de fosforilación mediados por el aumento de AMPc intracelular. En este tejido, la activación de ARTIS<sub>t</sub> produce la estimulación de la síntesis de esteroides en la mitocondria a través de la liberación de AA y su posterior metabolización a leucotrienos. Como ya se ha señalado, los leucotrienos participan en este proceso ya que regulan la transcripción y traducción de StAR; que a su vez regula el paso limitante en la síntesis de

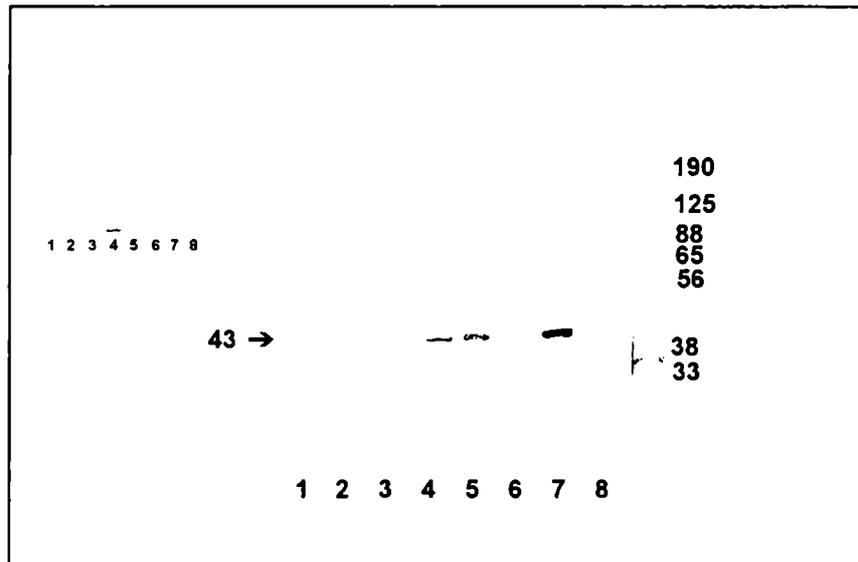
esteroides: el transporte del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna.

Considerando la posibilidad que ARTIS<sub>t</sub> pudiera ejercer su acción en otros tejidos, fue de nuestro interés estudiar la distribución tisular de esta proteína. Empleando como herramienta las inmunoglobulinas de los anticuerpos antipeptidos, se estudió la presencia de ARTIS<sub>t</sub> en distintos tejidos. Además de analizar muestras de tejidos esteroideogénicos como zona fasciculata y glomerulosa de adrenal, ovario y células de Leydig de testículo, se estudiaron muestras de hígado, corazón, próstata y riñón.

Se aislaron los citosoles de los distintos órganos y se sembraron alrededor de 10 µg de proteína de cada uno de ellos en geles de poliacrilamida-SDS. Luego de realizada la corrida electroforética y la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, éstas fueron incubadas con los anticuerpos antipeptidos de ARTIS<sub>t</sub>. Luego del revelado, se detectó una banda mayoritaria de 43 kDa (Figura 10). Se observó que la intensidad de la expresión de la proteína no era la misma en todos los tejidos.

En todos los tejidos esteroideogénicos analizados (adrenal, ovario y células de Leydig de testículo) se detectó la proteína ARTIS<sub>t</sub>. Como era de esperar, la banda del carril correspondiente a zona fasciculata de adrenal resultó particularmente intensa, aunque en el caso de las células de Leydig de testículo la señal fue más débil. Esto podría explicarse por la metodología empleada para la obtención de dichas células, descrita en la sección de Materiales y Métodos. Al llevar a cabo este proceso, se obtienen células intersticiales, de las cuales las células de Leydig representan un componente minoritario.

Examinando las preparaciones de los tejidos considerados tradicionalmente no esteroideogénicos, se encontró una señal muy alta en corazón y riñón, una muy tenue en hígado y prácticamente indetectable en próstata.



**FIGURA 10:** ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ARTIS<sup>t</sup> EN DISTINTOS TEJIDOS.

Se obtuvieron los citosoles de diversos órganos y se sembraron 10 µg de proteína de cada muestra en minigeles de poliacrilamida-SDS. Luego de la corrida electroforética, las muestras fueron analizadas por Western blot, utilizando en este caso inmunoglobulinas purificadas anti-FR7 (dilución: 1/500).

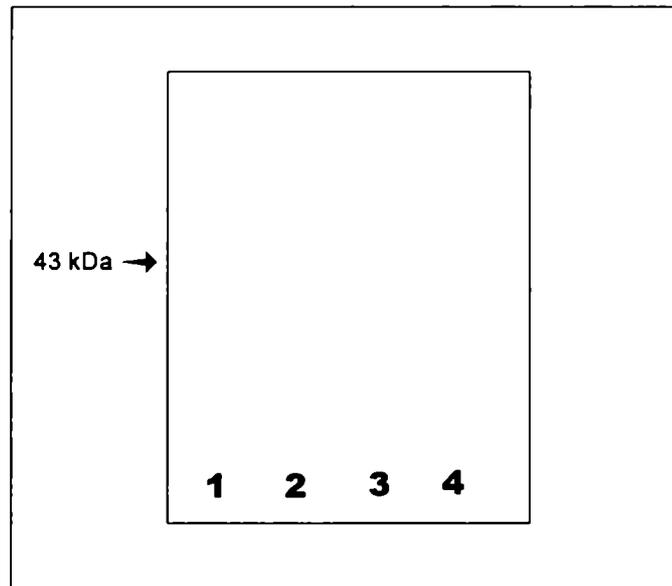
Carril 1: zona glomerulosa de adrenal, carril 2: ovario, carril 3: células de Leydig, carril 4: zona fasciculata de adrenal, carril 5: riñón, carril 6: hígado, carril 7: corazón, carril 8: próstata, carril de la derecha: standards de peso molecular.

Borde superior izquierdo: perfil de las proteínas teñidas con Ponceau S.

### **I- 3- Detección de ARTIST en citosol y mitocondria.**

La proteína ARTIST resultó homóloga a la proteína MTE-I, aislada de mitocondrias de hígado de rata tratadas con proliferadores de peroxisomas (Finkielstein y col, 1988). En tejidos esteroideogénicos, la proteína fue detectada tanto en citosol, como en mitocondrias. Como se comentó en la sección anterior, hemos detectado la presencia de ARTIST en citosol de tejidos no esteroideogénicos, por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar si ésta también se localizaba en las mitocondrias.

Como modelo de tejido no esteroideogénico elegimos al tejido cardíaco, ya que es uno de los órganos que expresa a la proteína con mayor intensidad (Figura 10). Se sometió a análisis por Western blot al citosol y a las mitocondrias del tejido cardíaco. De manera análoga a lo observado en adrenal, encontramos señal positiva en ambos compartimientos subcelulares cuando éstos fueron revelados con los anticuerpos contra péptidos de ARTIST (Figura 11).



**FIGURA 11:** DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE ARTISt.

Se separaron el citosol y las mitocondrias de tejido cardíaco y adrenal. Se analizaron 10  $\mu\text{g}$  de cada uno de ellos por Western blot, utilizando inmunoglobulinas purificadas anti-FR7 en una dilución 1/500.

Carril 1: mitocondrias de adrenal; carril 2: mitocondrias de corazón; carril 3: citosol de adrenal; carril 4: citosol de corazón.

## **II- ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN DE ARTIST CARDÍACA POR AGONISTAS ADRENÉRGICOS.**

### **II-1- Efecto de la perfusión cardíaca con isoproterenol.**

Varios antecedentes nos hicieron pensar que la proteína ARTIST podría estar sujeta a control adrenérgico en tejido cardíaco. Es sabido que luego de la estimulación mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos se comprueba el aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc y la fosforilación de proteínas endógenas. También está comprobado que el AA cumple un importante rol en tejido cardíaco. Es por eso que nuestro interés estuvo dirigido a estudiar si en corazón, la proteína ARTIST era capaz de ser activada por la acción de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Una forma de comprobar si ARTIST cardíaca podía ser estimulada hormonalmente fue realizando un ensayo similar al que se había utilizado para evaluar la activación de ARTIST en tejido adrenal.

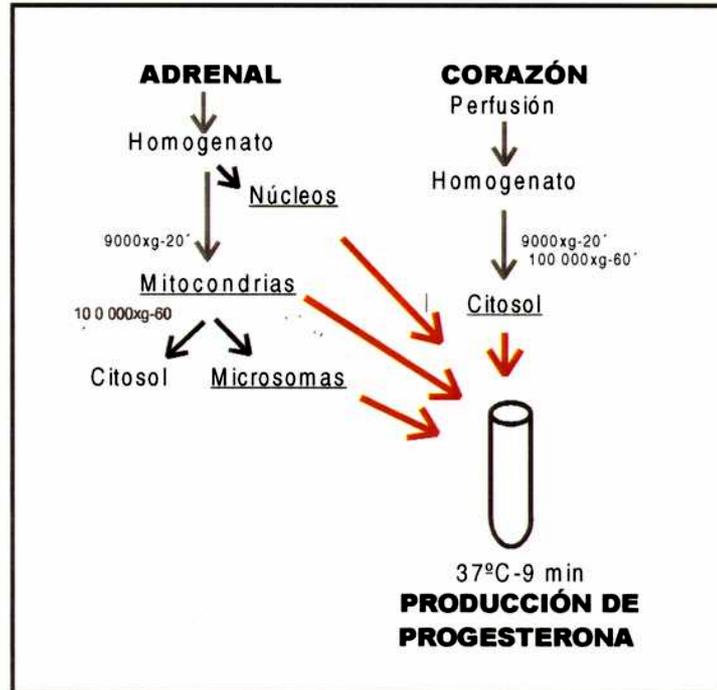
Por lo tanto, para poder cuantificar la bioactividad de ARTIST en tejido cardíaco se llevó a cabo un ensayo de recombinación de fracciones subcelulares heterólogas *in vitro*, que consiste básicamente en incubar las fracciones solubles provenientes de corazones de rata sometidas a distintos tratamientos con mitocondrias, microsomas y núcleos de zona fasciculata de adrenales controles. Las mitocondrias de adrenal poseen las enzimas para la conversión del colesterol en pregnenolona y progesterona, la fracción microsomal las enzimas necesarias para la metabolización del AA, mientras que la fracción proveniente de corazón sería la encargada de proveer la enzima ARTIST en su forma activada.

Como activador se utilizó isoproterenol, un agonista  $\beta$ -adrenérgico potente no selectivo con una afinidad muy baja por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. En consecuencia, isoproterenol genera efectos en todos los receptores  $\beta$  y prácticamente carece de acción sobre los  $\alpha$ .

Se perfundieron corazones de rata con isoproterenol  $10^{-7}$ M o con solución KHB solamente durante 15 minutos por el método de Langendorff, de acuerdo a lo detallado en la sección de Materiales y Métodos. El tejido cardíaco fue homogeneizado y se separaron los citosoles por centrifugación diferencial.

Tanto los citosoles controles (perfundidos con solución KHB) como los activados (perfundidos con isoproterenol) fueron incubados con mitocondrias, microsomas y núcleos de ratas controles (provenientes de ratas tratadas con dexametasona). Luego de 9 minutos de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante, se detuvo la reacción y se extrajeron los esteroides presentes. Una alícuota se utilizó para medir progesterona por radioinmunoensayo.

Para calcular el valor de progesterona producida durante el ensayo, al valor total de progesterona medida se le restó el contenido endógeno de progesterona de las mitocondrias, núcleos y microsomas de adrenal. En este caso el valor de progesterona del citosol cardíaco fue no detectable. Para su mejor comprensión, en la Figura 12 se detalla un esquema del ensayo de recombinación de fracciones subcelulares heterólogas *in vitro*.

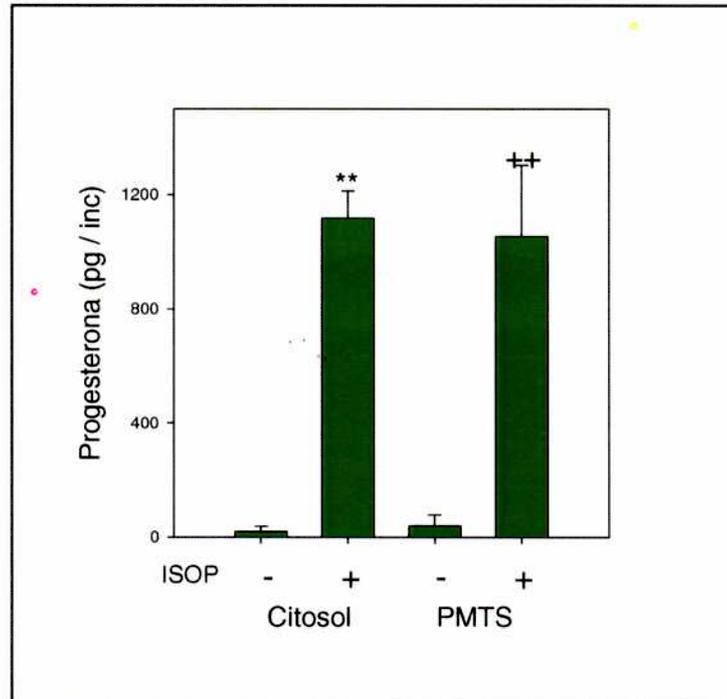


**FIGURA 12:** ESQUEMA DEL ENSAYO DE RECOMBINACIÓN DE FRACCIONES HETERÓLOGAS *IN VITRO*.

La Figura 13 muestra el gráfico de estimulación de la producción de progesterona por las mitocondrias adrenales cuando se enfrentaron con las distintas muestras cardíacas utilizadas en los ensayos de recombinación *in vitro*. Se observa que hay una producción neta de progesterona en el ensayo cuando se utilizan citosoles cardíacos activados, mientras que no hay valores detectables de progesterona cuando se utiliza un citosol control en el ensayo heterólogo. De este resultado se desprende que la estimulación cardíaca con isoproterenol produjo la activación de factores que fueron capaces de interactuar con las fracciones subcelulares controles de adrenal para producir la estimulación de la esteroidogénesis.

También se midió en el mismo experimento la producción de progesterona por incubación de citosoles activados de zona fasciculata de adrenal de ratas inyectadas con ACTH (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso) o con vehículo. En este caso la producción neta fue de  $3575 \pm 254$  pg de progesterona / incubación para el citosol activado versus  $532 \pm 87$  pg de progesterona / incubación para el citosol control.

En trabajos preliminares, en lugar de citosol cardíaco se utilizó el sobrenadante post-mitocondrial de corazón activado (es decir, la fracción que comprende al citosol y a los microsomas cardíacos) y se encontró estimulación de la esteroidogénesis (Figura 13). Sin embargo se observó una gran variabilidad entre los distintos ensayos. Esto se puede atribuir a que los microsomas cardíacos poseen la maquinaria enzimática que convierten al AA tanto en derivados de la vía de la ciclooxigenasa, como así también de la lipooxigenasa y de la epooxigenasa, por lo que la proporción de derivados lipooxigenados que se forman en el momento de la incubación pueden ser variables.



**FIGURA 13:** EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON ISOPROTERENOL.

Los corazones fueron perfundidos con isoproterenol  $10^{-7}$  M (ISOP) o con solución KHB durante 15 minutos. Tanto el citosol control y activado como el sobrenadante post-mitocondrial (PMTS) control y activado fueron recombinados con mitocondrias, microsomas y núcleos controles provenientes de adrenal en un ensayo de recombinación heterólogo *in vitro*. La progesterona fue extraída del medio de incubación con 1,5 ml de ciclohexano y el contenido fue determinado por radioinmunoensayo. Los valores representan las medias  $\pm$  ES,  $n=4$ . (\*\*) y (++) Valores significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ) de los valores basales. En la Figura se muestra un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

## **II-2- Participación de ARTIS<sub>t</sub> cardíaca en la activación observada en el ensayo de recombinación heterólogo.**

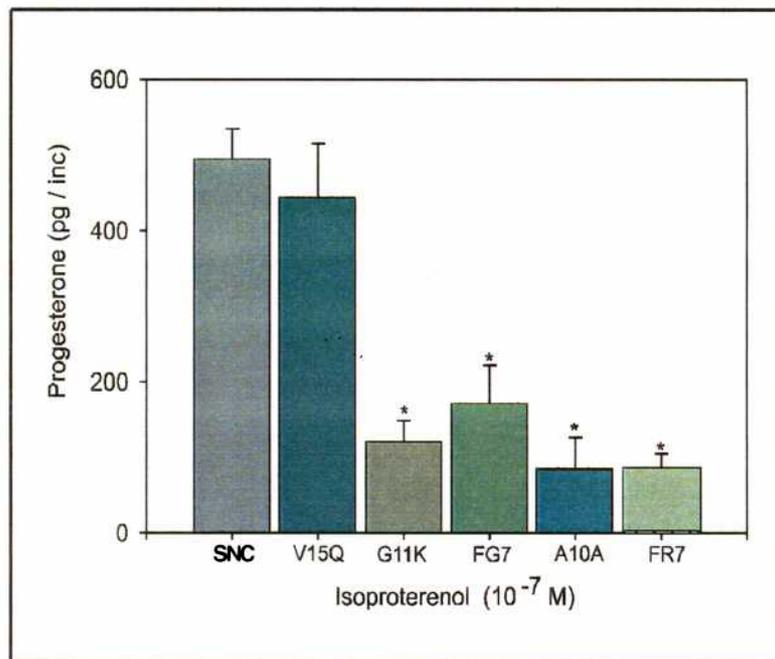
Luego de demostrar el efecto estimulador de las fracciones cardíacas activadas sobre la esteroidogénesis en mitocondrias de adrenal, el objetivo siguiente fue comprobar la participación de la proteína ARTIS<sub>t</sub> de corazón en la estimulación observada durante el ensayo de recombinación heterólogo de fracciones subcelulares. Con ese propósito, se investigó si al bloquear la proteína ARTIS<sub>t</sub> presente en la fracción cardíaca con anticuerpos antipeptídicos específicos, se conservaban o no las propiedades estimuladoras de dicha fracción.

Los citosoles provenientes de corazones perfundidos con isoproterenol  $10^{-7}$ M se incubaron con los distintos anticuerpos antipeptídicos de ARTIS<sub>t</sub> y con suero normal de conejo. Éstos fueron agregados en una dilución final 1:100 y la incubación se realizó durante 16 horas a 4°C. Como control también se realizó el ensayo con citosol proveniente de corazones perfundidos con la solución amortiguadora KHB.

La Figura 14 muestra la producción de progesterona en los ensayos de recombinación heteróloga cuando se enfrentaron los citosoles incubados con los distintos anticuerpos; con las mitocondrias, microsomas y núcleos provenientes de la zona fasciculata-reticular de adrenal.

Los citosoles provenientes de corazones activados que habían sido preincubados con suero normal de conejo y el anticuerpo anti-V15Q no mostraron diferencia significativa con respecto a la estimulación de la esteroidogénesis. En cambio, los citosoles que fueron incubados con los anticuerpos anti-G11K, anti-FR7, anti-A10A y anti-FG7 mostraron una inhibición

significativa en la estimulación de la producción de progesterona. Por otro lado, los valores de progesterona del citosol control fueron no detectables.



**FIGURA 14:** INCUBACIÓN DE LOS CITOSOLES ESTIMULADOS CON ISOPROTERENOL CON ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA PÉPTIDOS DE ARTIST.

Se obtuvieron citosoles de corazones estimulados con isoproterenol  $10^{-7}$ M. Se incubaron alícuotas de 100  $\mu$ l (400  $\mu$ g de proteína) toda la noche con diferentes anticuerpos antipéptidos de ARTIST (1:100) o con suero normal de conejo (SNC) (1:100) a 4°C. Luego de la incubación, los citosoles fueron recombinados con mitocondrias, microsomas y núcleos de adrenales controles y se midió la producción de progesterona por radioinmunoanálisis.

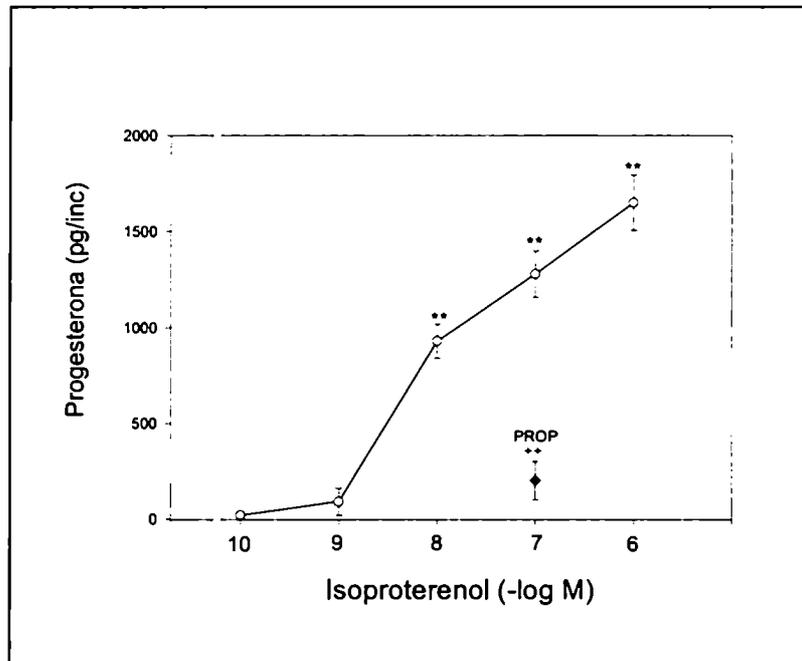
Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES, n=4. \* Significativamente diferente del valor SNC ( $P < 0.05$ ). En el gráfico se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Citosol control: valores no detectables.

### **II-3- Curva dosis-respuesta con isoproterenol. Bloqueo con propranolol.**

La estimulación de la esteroidogénesis adrenal por citosoles cardíacos activados con isoproterenol se produjo en un rango de concentraciones entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$ M de isoproterenol. La Figura 15 muestra la curva dosis-respuesta para la estimulación de la producción de progesterona por citosoles de corazones perfundidos con concentraciones crecientes de isoproterenol.

Con el objetivo de confirmar que isoproterenol activa ARTISt cardíaca por un mecanismo mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos se investigó el efecto de un  $\beta$ -bloqueante previo al estímulo adrenérgico.

Se realizó la perfusión del miocardio con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol ( $10^{-5}$ M) durante 15 minutos antes de la perfusión del órgano con isoproterenol  $10^{-7}$ M. En este caso, al realizar el ensayo de recombinación heterólogo, se observó una inhibición en la activación de la producción de progesterona (Figura 15), lo que sugiere que el mecanismo de activación de la fracción cardíaca está mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos.



**FIGURA 15:** EFECTO DEL ISOPROTERENOL Y PROPRANOLOL.

Los corazones fueron perfundidos durante 15 minutos con diferentes concentraciones de isoproterenol (°) o con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol ( $10^{-5}$  M) y luego por otros 15 minutos con isoproterenol  $10^{-7}$  M (◆). Los citosoles provenientes de los corazones perfundidos fueron re combinados con mitocondrias, microsomas y núcleos de adrenales controles en un ensayo de recombinación *in vitro*. La progesterona fue extraída del ensayo con 1.5 ml de ciclohexano y su contenido determinado por radioinmunoensayo. Los datos se muestran como media  $\pm$  ES, n=4. \*\* Significativamente diferente ( $P < 0.01$ ), de los valores basales; ++ significativamente diferente de isoproterenol  $10^{-7}$  M ( $P < 0.01$ ). Los resultados que se muestran en el gráfico son de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

**II-4- Efecto del inhibidor de proteín-quinasa AMPc dependiente en el ensayo de recombinación heterólogo.**

Los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos interactúan con su receptor desencadenando una serie de eventos en los que se observa un aumento en la concentración de AMPc y activación de la proteín-quinasa AMPc dependiente. Durante la perfusión del miocardio con isoproterenol, éste interacciona con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y se produce por lo tanto la activación de dicha proteín-quinasa. Ésta es la encargada de fosforilar los sustratos endógenos que actúan en la respuesta cardíaca.

Podría ocurrir que el efecto observado en el ensayo de recombinación *in vitro* fuera, en parte, debido a la acción de la proteín-quinasa activada. Con el objetivo de descartar un efecto directo de esta enzima, presente en el citosol cardíaco activado, sobre las mitocondrias controles de adrenal, se preincubó al citosol con un inhibidor de la proteín-quinasa AMPc dependiente (PKI:100  $\mu$ g/ml), previo al ensayo de recombinación heterólogo. En experimentos paralelos hemos comprobado que a la concentración utilizada, PKI inhibe la actividad de proteín-quinasa en tejido cardíaco.

Se comprobó que no hay diferencia significativa en la estimulación de la producción de progesterona con la preincubación con inhibidores de la proteín-quinasa (TABLA A), lo que sugiere que el efecto observado es debido a la activación de ARTIS<sub>t</sub> por isoproterenol.

TABLA A:

<i>Citosol</i>	<i>PKI</i>	<i>Progesterona (pg/inc)</i>
<b>Control</b>	-	No Detectable
	+	No Detectable
<b>ISOP</b>	-	810 ± 60
	+	780 ± 30

*PKI*: inhibidor de la proteín-quinasa AMPc dependiente.

#### **II-5- Efecto de inhibidores del metabolismo del AA.**

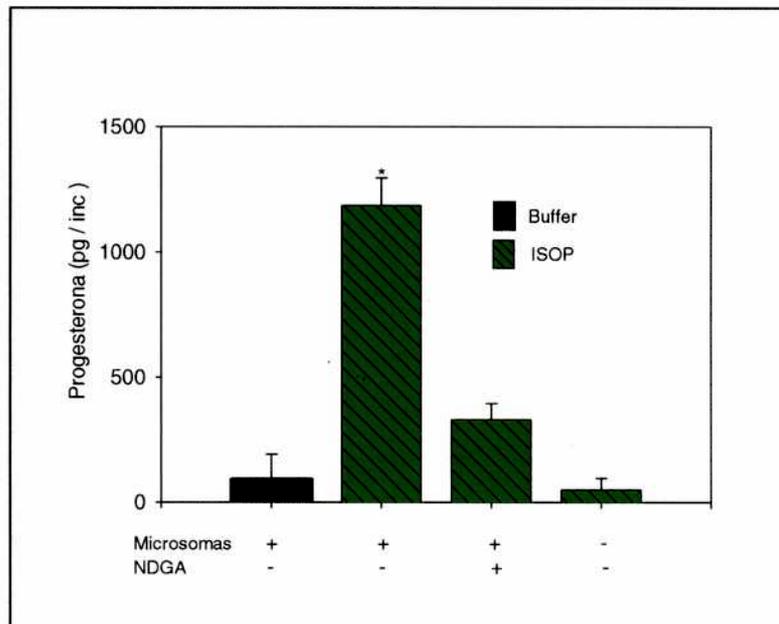
Según ha sido demostrado por varios autores, en el mecanismo de activación de la glándula adrenal por ACTH, el AA es metabolizado por la vía de la lipooxigenasa para cumplir su papel estimulador en la esteroidogénesis. Las enzimas encargadas de la metabolización del AA se encuentran localizadas en los microsomas de las células adrenales.

Nos propusimos estudiar si la respuesta observada al colocar ARTIST de corazón en el ensayo de recombinación heterólogo *in vitro* estaba mediada por el AA y los metabolitos de la lipooxigenasa. Con ese propósito, se evaluó si la inhibición de las enzimas encargadas de la metabolización del AA afectaba la estimulación producida en el ensayo de recombinación heterólogo.

Se realizó una serie de experimentos destinados a investigar el efecto del ácido nordihidroguayarático (NDGA), un inhibidor de la vía de la lipooxigenasa,

sobre los microsomas controles de adrenal en el ensayo de recombinación heterólogo anteriormente descrito.

Con tal propósito se incubó una alícuota de fracción microsomal de zona fasciculata de adrenal con y sin ácido NDGA en una concentración final de 5 $\mu$ M durante 30 minutos a 37°C. Estas fracciones fueron luego usadas en el ensayo de recombinación heterólogo con citosoles activados y controles de corazón. Cuando la incubación se realizó en presencia de los microsomas preincubados con el inhibidor NDGA, se observó una disminución significativa de la estimulación de la síntesis de esteroides en el ensayo de recombinación heterólogo. Por otra parte, cuando el ensayo de recombinación heterólogo se realizó en ausencia de la fracción microsomal, no se observó estimulación (Figura 16).



**FIGURA 16:** EFECTO DEL NDGA.

Los microsomas adrenales fueron preincubados por 30 minutos a 37°C con el inhibidor NDGA (5µM) o con solución KHB solamente. Los citosoles provenientes de corazones perfundidos con isoproterenol 10<sup>-7</sup>M o con la solución KHB fueron recombinados con o sin las fracciones subcelulares controles de adrenales en un ensayo de recombinación heterólogo. La progesterona producida fue medida por radioinmunoensayo. Los datos que se muestran están expresados como media ± ES, n=4. \* Significativamente diferente de los valores controles ( $P < 0.05$ ). Los resultados que se muestran son de un experimento típico, representativo de tres experimentos independientes.

En conjunto, los resultados de los experimentos hasta aquí detallados indican la presencia de la proteína ARTIS<sub>t</sub> en la fracción cardíaca, que responde a las siguientes características:

- a) Es activable por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en forma dosis-dependiente.
- b) Su mecanismo de acción ocurre a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- c) Su actividad es inhibida por anticuerpos antipeptídicos de ARTIS<sub>t</sub>.
- d) Es capaz de estimular *in vitro* la esteroidogénesis en mitocondrias de adrenal.
- e) Para llevar a cabo este proceso necesita de la fracción microsomal y de las enzimas de la metabolización del AA en leucotrienos.

### **III- ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE ARTIST EN CORAZÓN**

#### **III-1- Presencia del ARNm de ARTIST en tejidos no esteroideogénicos.**

##### **III-1-a- Detección de los transcritos de ARTIST en distintos tejidos.**

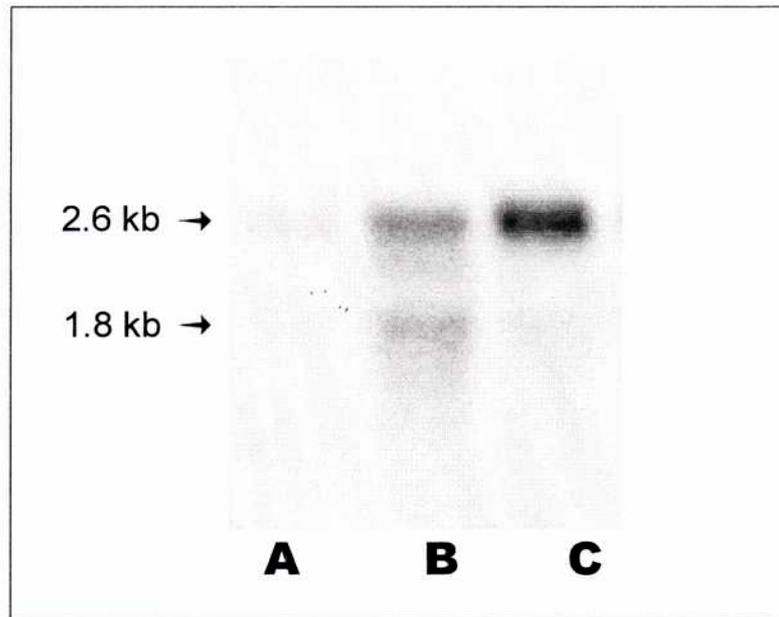
De acuerdo a los resultados ya presentados, utilizando un ensayo de recombinación de fracciones heterólogas *in vitro*, hemos demostrado que en tejido cardíaco la proteína ARTIST es regulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y es capaz de incrementar la liberación de AA.

En trabajos previos realizados en nuestro Laboratorio, hemos analizado la presencia del ARN mensajero que codifica para ARTIST en distintos tejidos esteroideogénicos (Finkielstein y col, 1998). Utilizando la técnica de Northern blot, se detectaron dos transcritos en ovario de ratas pseudopreñadas, en zona fasciculata y glomerulosa de adrenal de rata y en la línea tumoral de testículo de ratón MA-10.

Teniendo en cuenta estos precedentes, nos propusimos caracterizar el ARNm de ARTIST en tejidos considerados tradicionalmente no esteroideogénicos. Utilizando la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos, se aisló el ARN total de hígado, corazón y riñón de ratas sometidas a una dieta habitual, sin ningún tipo de tratamiento y se analizó por Northern blot. Para analizar el ARNm de ARTIST se utilizó una sonda de 702 pb que reconoce la secuencia interna de la molécula.

La autorradiografía de las membranas hibridadas con dicha sonda muestra la presencia del ARNm en estos tejidos (Figura 17). En riñón se observa

la presencia de dos transcritos de similar intensidad de 2,6 y 1,8 kb. En corazón también se observan los dos transcritos, pero el de menor tamaño posee menor intensidad y sólo se revela luego de varios días de exposición. En hígado, en estas condiciones, la señal es prácticamente indetectable.



**FIGURA 17:** ESTUDIO DE LA PRESENCIA DEL ARNm DE ART1St EN TEJIDOS NO ESTEROIDOGÉNICOS.

Se obtuvo el ARN total a partir de homogenatos de distintos tejidos no esteroideogénicos. Una alícuota de 24  $\mu\text{g}$  de cada uno de ellos fue sembrada en cada carril y analizada por la técnica de Northern blot utilizando una sonda de 702 pb, específica para ART1St.

Carril A: hígado; carril B: riñón; carril C: corazón.

**III-1-b- Identificación de los transcritos de ARTIS<sub>t</sub> en tejido cardíaco.**

Con el objetivo de analizar la naturaleza de los dos transcritos detectados en tejido cardíaco se aisló el ARN total de dicho tejido, se sembraron 24 µg de muestra en el carril de un gel desnaturalizante de agarosa y se sometió a electroforesis y transferencia a una membrana de nylon. Dicho carril fue incubado con tres sondas diferentes en forma sucesiva.

Las sondas que se utilizaron fueron:

a) Una sonda de 702 pb preparada a partir de un producto de amplificación por PCR. Ésta reconoce una porción de la secuencia interna del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> a partir de su extremo 3', por lo tanto reconoce tanto la isoforma citosólica como la mitocondrial.

b) Una sonda de 300 pb que reconoce solamente la isoforma mitocondrial de ARTIS<sub>t</sub>, ya que la misma está dirigida contra la secuencia correspondiente al péptido señal.

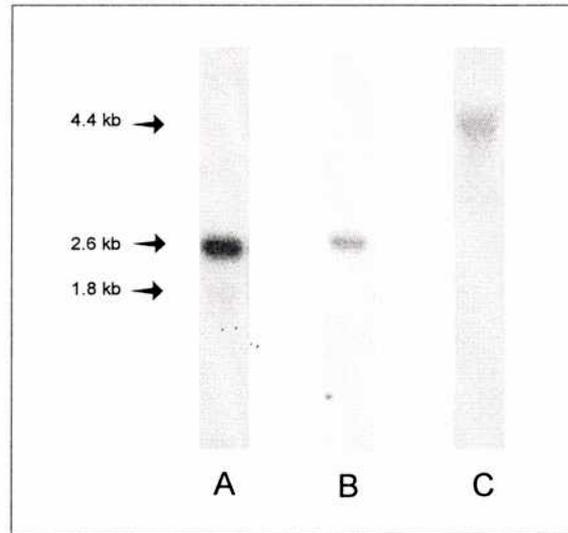
c) Una sonda que reconoce al 28S ribosomal.

La membrana fue revelada en primer lugar con la sonda de 702 pb que ya se había utilizado previamente. Una vez visualizada la autorradiografía correspondiente, la membrana se sometió a varios lavados con SDS 0,1% a 100°C con la finalidad de despegar la sonda. Luego de ser sometida al tratamiento descrito en Materiales y Métodos, la membrana fue incubada con la sonda que sólo reconoce la isoforma mitocondrial de ARTIS<sub>t</sub>. Finalmente la

membrana fue lavada nuevamente y se incubó con una sonda que reconoce al 28S ribosomal.

Como ya se había señalado en la sección anterior, la sonda de 702 pb reconoce un transcripto mayoritario de alrededor de 2,6 kb y otro de menor intensidad de alrededor de 1,8 kb (Figura 18-a). De acuerdo a lo observado, la sonda que reconoce la secuencia del péptido señal hibrida con el transcripto de 2,6 kb (Figura 18-b). Por otra parte, la sonda de 28S reconoce una banda de 4.4 kb (Figura 18-c). Esta sonda se eligió para ser utilizada de control en cada experimento, ya que la intensidad de la banda sólo es proporcional a la cantidad de muestra sembrada, y no varía bajo distintos estímulos hormonales o condiciones nutricionales.

Del conjunto de los resultados se deduce que en corazón se encuentran por lo menos dos isoformas de ARTIS<sub>t</sub> y que éstas poseen distinta localización subcelular, correspondiendo el transcripto mayoritario de 2,6 kb a la isoforma mitocondrial, y el minoritario a la isoforma de localización citosólica.



**FIGURA 18:** NORTHERN BLOT DE CORAZÓN REVELADO CON DIFERENTES SONDAS.

24  $\mu\text{g}$  de ARN total proveniente de tejido cardíaco fue sembrado en un gel desnaturalizante de agarosa y sometido a electroforesis y electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa. El carril fue luego incubado con distintas sondas en forma sucesiva, de acuerdo a como se detalla en Materiales y Métodos.

Carril A: membrana revelada con una sonda de 702 pb que reconoce una secuencia interna de ARTIST; carril B: membrana revelada con una sonda de 300 pb que reconoce la zona correspondiente al péptido señal; carril C: membrana revelada con una sonda que reconoce al 28S ribosomal.

### **III-2- Regulación de los niveles del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> por agonistas $\beta$ -adrenérgicos.**

#### **III-2- a- Efecto del isoproterenol y del propranolol sobre los niveles del ARNm de ARTIS<sub>t</sub>.**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que en glándula adrenal, el ARNm de ARTIS<sub>t</sub> se halla bajo regulación hormonal por ACTH, encontrándose una rápida estimulación, que resulta máxima a los quince minutos. El efecto de ACTH sobre el transcrito de ARTIS<sub>t</sub> fue inhibido por actinomicina D y aumentado por cicloheximida, presumiblemente por aumento en la estabilidad del mensajero. Por otro lado, la inyección con dexametasona cuatro horas previas al sacrificio, produjo una disminución de dicho transcrito, lo que concuerda con una reducción en los niveles circulantes de ACTH (Finkielstein y col, 1998).

Dada la presencia del mensajero de ARTIS<sub>t</sub> en tejido cardíaco fue de nuestro interés investigar si existía una regulación de la expresión de la proteína a nivel transcripcional por estímulo hormonal como se había demostrado que había en glándula adrenal.

Se empleó el mismo modelo de perfusión de corazón que había sido utilizado anteriormente. Se realizó una serie de experimentos en los cuales los corazones fueron perfundidos durante 15 minutos con isoproterenol  $10^{-7}$ M o con buffer KHB en el caso de los controles. Luego de realizada la perfusión, se aisló el ARN total del tejido cardíaco siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Seguidamente se sembraron 24  $\mu$ g de ARN en geles desnaturizantes de agarosa y las muestras fueron analizadas por Northern blot.

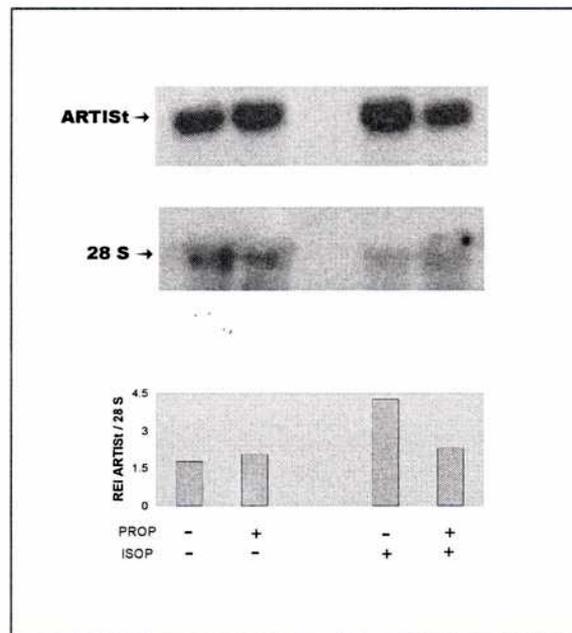
Los niveles de ARNm fueron cuantificados por densitometría óptica de cada una de las autorradiografías. Los valores se expresan como la relación entre la densidad óptica del transcrito de ARTIS<sub>t</sub> dividido por la densidad óptica de la banda de 28S ribosomal.

En la Figura 19 se muestra la autorradiografía de una membrana incubada con la sonda para ARTIS<sub>t</sub> (panel superior), la misma incubada con una sonda que reconoce al 28S (panel del medio) y la relación entre las densidades de las bandas correspondientes a ARTIS<sub>t</sub> y 28S (gráfico inferior).

Se encontró un aumento en la cantidad de ARNm de ARTIS<sub>t</sub> correspondiente a los corazones estimulados con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol. En la Figura se muestra solamente la banda correspondiente a 2,6 kb, ya que la otra se expresa en forma muy tenue y no es posible detectar diferencias. El hecho que el transcrito de 1,8 kb se halle en un nivel muy bajo de expresión, no nos permite apreciar si éste también se encuentra regulado transcripcionalmente.

Con el objetivo de comprobar si los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están involucrados en la respuesta estimuladora observada a nivel transcripcional, a un lote de corazones se los perfundió previamente con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol ( $10^{-5}$ M), observándose en este caso un bloqueo de la respuesta, ya que la abundancia del transcrito se asemeja a la de los controles (Figura 19).

El conjunto de estos resultados indican que isoproterenol ejerce un efecto estimulador, ya que aumenta la abundancia del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> en tejido cardíaco, y este efecto está mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos.



**FIGURA 19:** EFECTO DEL ISOPROTERENOL Y PROPRANOLOL.

Los corazones de rata fueron perfundidos con propranolol  $10^{-5}M$  o con solución KHB previo a la perfusión con isoproterenol  $10^{-7}M$  o KHB como se indica en cada caso. El ARN total fue analizado por Northern blot con una sonda de 702 pb (panel superior) o una sonda que reconoce al 28S (panel del medio).

La abundancia relativa de los niveles de ARNm de ARTIST (panel inferior) se determinaron como el cociente entre las densidad óptica de las bandas del primer panel y las correspondientes al 28S. En la Figura se muestra un ejemplo de tres experimentos independientes.

### III-2- b- Efecto del 8-Br AMPc.

El aumento intracelular de las concentraciones de AMPc, luego de la estimulación extracelular con distintas drogas y hormonas, es una señal que dispara una diversidad de acciones biológicas. Estas acciones son producidas por la activación de la proteína-quinasa AMPc dependiente, que fosforila sustratos localizados en el citoplasma y en las membranas biológicas. La elevación de AMPc es el mecanismo establecido en el corazón para regular la contractilidad y la actividad marcapasos. De esta manera se produce el control de la actividad cardíaca.

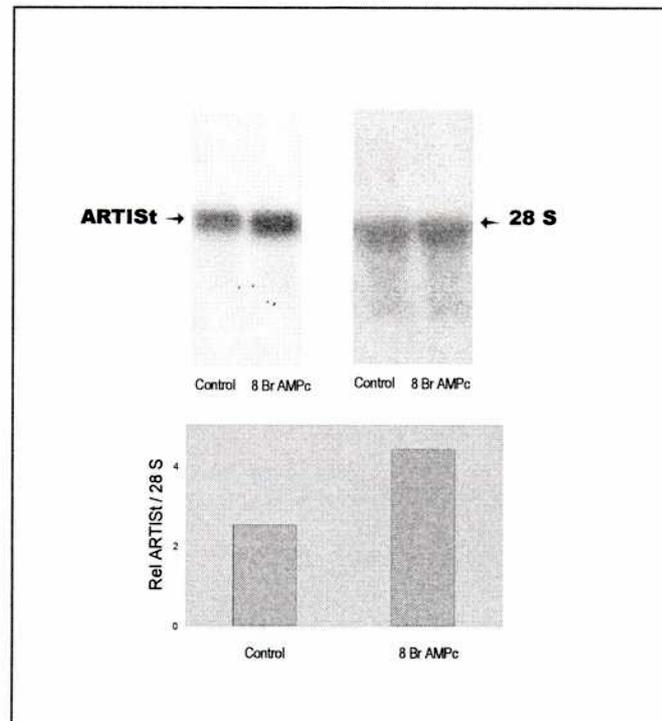
Además de estas acciones funcionales, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica induce efectos metabólicos y tróficos al aumentar la concentración de AMPc citosólico (Krebs y col, 1979; Mellon y col, 1989). Se ha comprobado también la fosforilación del receptor  $\beta$ -adrenérgico (Lefkowitz y col, 1990), la regulación de la transcripción de una variedad de genes respondedores a AMPc (Collins y col, 1992) y de la expresión de la síntesis de diferentes proteínas regulatorias del miocardio (Vandromme y col, 1996). Estos mecanismos genómicos son importantes en la patofisiología de la enfermedad cardíaca (Smith y col, 1990).

Como hemos demostrado; isoproterenol ejerce un efecto regulatorio sobre la expresión del ARNm de ART1St en corazón a través de la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El próximo paso fue estudiar si el AMPc era capaz de mimetizar este efecto.

Un grupo de corazones fue estimulado con un análogo permeable de dicho compuesto, el 8-BrAMPc ( $10^{-4}$ M) y otro grupo con buffer KHB. La perfusión se realizó durante 15 minutos, luego de lo cual las diferentes muestras fueron

homogeneizadas en Trizol. Seguidamente se procedió a la extracción del ARN en la forma descrita previamente.

La Figura 20 muestra las autorradiografías correspondientes al Northern blot revelado con la sonda de 702 pb y la de 28S. (Panel superior y medio). Calculando las densidades relativas entre las bandas, se observa un aumento en la abundancia del transcrito correspondiente al corazón tratado con 8-Br AMPc, lo que indica una regulación AMPc-dependiente de los niveles de ARNm de ART1St.



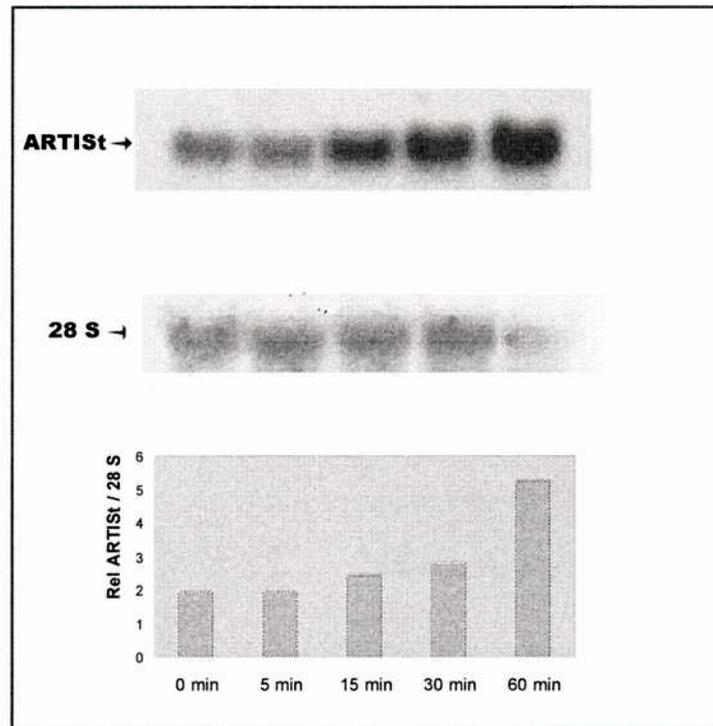
**FIGURA 20:** EFECTO DEL 8-Br AMPc.

Se realizó la perfusión de los corazones con 8-Br AMPc  $10^{-4}$ M o con solución KHB durante 15 minutos. El ARN de las muestras fue analizado por Northern blot, utilizando una sonda de 702 pb (panel izquierdo) o 28S (panel derecho). Las densidades relativas entre ambos transcritos se muestran en el gráfico situado en el panel inferior. La Figura representa uno de tres experimentos independientes.

**III-2- c- Efecto del tiempo de perfusión con isoproterenol sobre los niveles de ARNm de ARTIST.**

Se realizaron una serie de experimentos en los cuales los corazones fueron perfundidos con isoproterenol  $10^{-7}M$  durante distintos tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 minutos). Se separó el ARN total de los corazones y se analizó el ARNm de ARTIST por Northern blot de la manera detallada previamente.

En la Figura 21 se muestra la autorradiografía de una membrana incubada con la sonda para ARTIST (panel superior), la misma incubada con una sonda que reconoce 28 S (panel del medio) y la relación entre las densidades de las bandas correspondientes a ARTIST y las correspondientes a 28S (gráfico inferior). Del gráfico se desprende que isoproterenol produce un aumento en la abundancia del ARNm de ARTIST en tejido cardíaco luego de los quince minutos de perfusión.



**FIGURA 21:** NIVELES DEL ARNm DE ART1st EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE PERFUSIÓN CON ISOPROTERENOL.

Se perfundieron corazones con isoproterenol  $10^{-7}M$  a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 y 60 minutos). Se obtuvo el ARN total de dichas muestras y éstas fueron analizadas por Northern blot, utilizando una sonda de 702 pb (panel superior) y una sonda que reconoce al 28S (panel del medio). En el panel inferior se muestra la relación entre las densidades de las bandas. La Figura que se muestra es representativa de tres experimentos independientes.

**III-2- d- Efecto de la actinomicina D.**

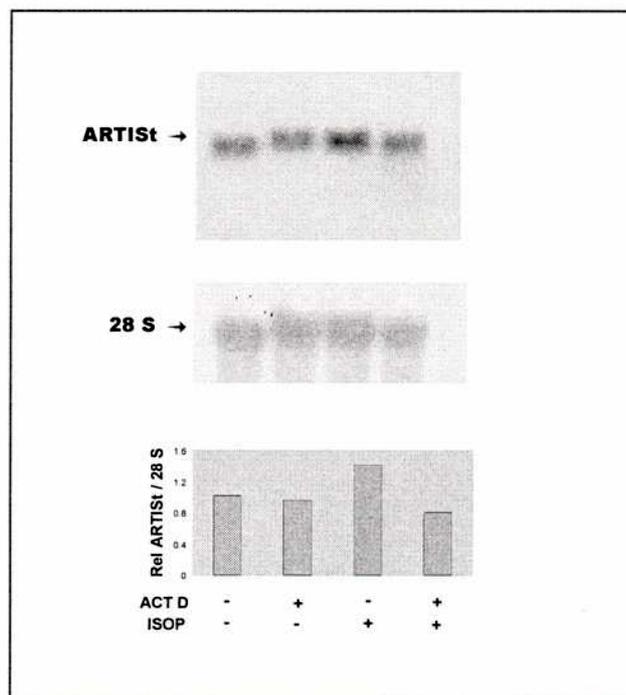
La actinomicina D es un antibiótico que contiene cadenas de polipéptidos de una cepa de *Streptomyces*, que inhibe la transcripción de genes (Stryer, 1995). Se une fuerte y específicamente a la doble hélice del ADN y por lo tanto impide que ésta sea un efectivo templado para la síntesis de ARN. No se une a ADN o ARN de simple cadena, ARN de doble cadena o híbridos ADN-ARN. La unión de la actinomicina D al ADN está aumentada por la presencia de residuos de guanina. Estudios espectroscópicos e hidrodinámicos de estos complejos sugieren que el anillo de fenoxasona se inserta en el medio de las bases del ADN, mediante un proceso denominado intercalado. A bajas concentraciones, la actinomicina D inhibe la transcripción sin afectar apreciablemente la replicación del ADN o la síntesis de proteínas, debido a esto la actinomicina D ha sido usada como un inhibidor específico de la formación de ARN tanto en células procariotas como eucariotas.

Se estudió el efecto de la actinomicina D (ACT D), sobre la expresión del ARNm de ART1st en tejido cardíaco. Se utilizaron cuatro lotes de ratas que fueron sometidas a distintos tratamientos, desarrollándose el siguiente protocolo experimental resumido en la Tabla B:

**TABLA B:**

<b>LOTE</b>	<b>INYECCIÓN</b>	<b>PERFUSIÓN</b>
<b>A</b>	Vehículo - 45 min antes del sacrificio	Solución KHB
<b>B</b>	ACT D (500 µg/kg) - 45 min antes del sacrificio	Solución KHB
<b>C</b>	Vehículo - 45 min antes del sacrificio	ISOP 10 <sup>-7</sup> M.
<b>D</b>	ACT D (500 µg/kg) - 45 min antes del sacrificio	ISOP 10 <sup>-7</sup> M.

De la misma manera que en los experimentos anteriores, luego de la perfusión cardíaca se homogeneizó el tejido cardíaco en Trizol y el ARN correspondiente fue analizado por Northern blot. Se observó una disminución en la densidad relativa del transcripto de ART1St cuando las ratas fueron inyectadas con actinomicina D antes de la perfusión con isoproterenol (Figura 22).



**FIGURA 22:** EFECTO DE LA ACTINOMICINA D SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE ARTIST.

Un lote de ratas fue inyectado con actinomicina D (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y otro con vehículo 45 min antes de la perfusión. Los corazones fueron perfundidos con isoproterenol  $10^{-7}$  M o con solución KHB, según se indica en la figura. Seguidamente el ARN de las muestras fue aislado y analizado por Northern blot utilizando una sonda de 702 pb (panel superior) y una sonda que reconoce al 28S (panel del medio). En el panel inferior se muestra la relación entre las densidades de las bandas. La Figura representa uno de cuatro experimentos independientes.

**III-3- Efecto de los proliferadores de peroxisomas sobre los niveles del ARNm de ARTISt.**

Además de estudiar la regulación de la expresión de ARTISt en corazón por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, fue de nuestro interés investigar la importancia de otros factores regulatorios sobre los niveles de ARNm de ARTISt cardíaco.

Los primeros trabajos efectuados por el grupo de Miyasawa y col, demostraron que el tratamiento con proliferadores de peroxisomas en ratas y ratones incrementaba en forma muy acentuada la actividad de acil-CoA tioesterasa en hígado (Miyasawa y col, 1981). Estos trabajos iniciales permitieron posteriormente aislar y caracterizar en hígado una familia de acil-CoA tioesterasas que, aunque en condiciones normales eran apenas detectables, aumentaban su expresión en citosol, mitocondria y peroxisomas por tratamiento de los animales con proliferadores de peroxisomas.

Estos compuestos comprenden un heterogéneo grupo de ácidos que incluyen los fibratos, ftalatos, plasticidas, herbicidas, antagonistas de leucotrienos, ácidos grasos naturales y modificados, ácido acetil-salicílico y ciertas drogas que reducen el nivel de colesterol y triglicéridos en suero. Entre otros; causan efectos hipolipemiantes, que están mediados por cambios en los niveles transcripcionales (Shoonjans y col, 1996).

La proliferación de peroxisomas es una respuesta celular pleiotrópica a esta gran diversidad de compuestos químicos y que en ciertas condiciones patofisiológicas involucran cambios drásticos en la morfología celular y en la actividad enzimática (Lock y col, 1989; Reddy y col, 1983).

Los proliferadores de peroxisomas son un conjunto de compuestos de diversidad estructural que median sus efectos via los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Los PPARs son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (Kastner y col, 1995). Se han descrito a la actualidad tres isoformas de PPARs en mamíferos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (también conocido como  $\delta$ , NUC 1 o FAAR) y PPAR $\gamma$ , codificados por tres genes diferentes.

PPAR $\alpha$  se expresa predominantemente en hígado, corazón, riñón mucosa intestinal y tejido adiposo, tejidos que tiene una tasa catabólica alta para ácidos grasos y metabolismo peroxisomal (Isseman y col, 1990). PPAR $\beta$  se expresa abundantemente y en forma ubicua y PPAR $\gamma$  tiene una expresión mucho más restringida, predominantemente en tejido adiposo (Braissant y col, 1996).

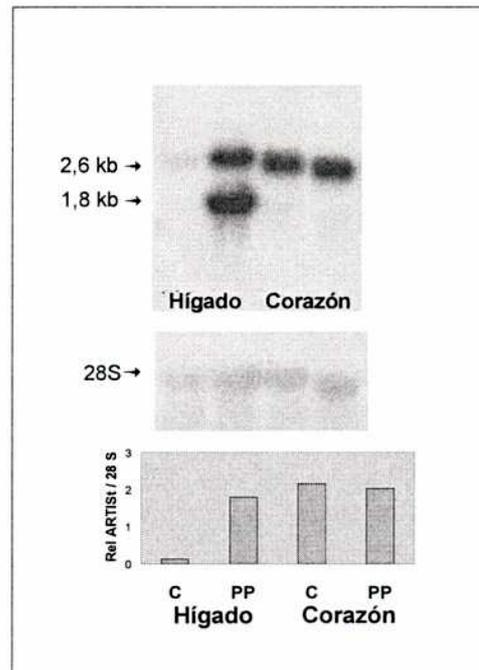
Se ha demostrado que los promotores de los genes que responden a proliferadores de peroxisomas contienen un sitio específico de unión para PPAR. Estos sitios, denominados elementos respondedores de proliferadores de peroxisomas (PPRE) se asemejan a las secuencias de reconocimiento de otros receptores nucleares y están compuestos de secuencias repetitivas de seis nucleótidos -AGGTCA- espaciados por un nucleótido (elemento DR1). Los PPAR $\alpha$  se heterodimerizan con el receptor del retinoide X y se unen a los PPREs en la región promotora de ciertos genes, como por ejemplo la acil-CoA oxidasa y la enoil-CoA hidratasa (Gearing y col, 1993).

Se ha propuesto que varios ácidos grasos naturales y eicosanoides sirven como activadores fisiológicos de los PPARs (Forman y col, 1997), sugiriendo un nuevo mecanismo regulatorio donde los lípidos de la dieta y sus metabolitos pueden regular la transcripción de genes e influir sobre el balance energético (Kliwer y col, 1999).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, fue de nuestro interés investigar si los proliferadores de peroxisomas afectaban la actividad de ARTIS<sub>t</sub> en corazón (Neuman y col, 2000).

Se utilizó un grupo de ratas alimentadas con una dieta que contenía 2% de di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) durante un período de dos semanas. Otro grupo fue alimentado con la dieta habitual (grupo control). Luego de este período los animales fueron sacrificados y se aislaron el hígado y el corazón. El ARN de esos tejidos fue analizado de acuerdo a las técnicas descriptas anteriormente.

Se encontró que en hígado se inducen las dos isoformas de ARTIS<sub>t</sub>, mientras que en corazón no se observaron diferencias entre las muestras controles y las tratadas con proliferadores de peroxisomas (Figura 23). De la misma manera, en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que en glándula adrenal tampoco había regulación del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> por proliferadores de peroxisomas (datos no publicados).



**FIGURA 23:** ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE ARTIST EN HÍGADO Y CORAZÓN EN RATAS TRATADAS CON PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS.

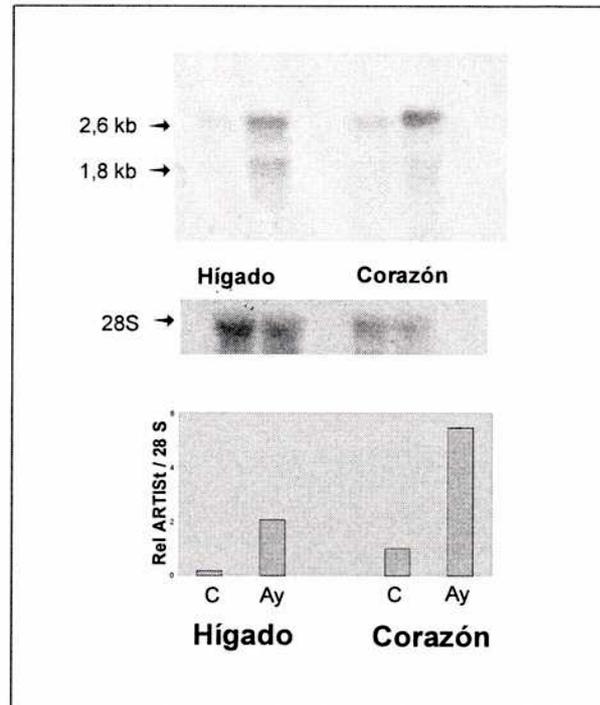
Un grupo de ratas fue alimentada con di(2-etilhexil)ftalto (DEHP) al 2% por dos semanas. Otro grupo fue sometido a una dieta habitual. Se aisló el ARN total de los homogenatos de hígado y corazón de ambos grupos y se analizó por Northern blot utilizando una sonda de 702 pb (panel superior) y una sonda que reconoce al 28S (panel del medio). En el panel inferior se muestra la relación entre las densidades de las bandas de 2,6 kb de ARTIST y la del 28S. En la Figura se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

### **III-4- Regulación de los niveles del ARNm de ARTISt por ayuno.**

En trabajos iniciales, cuando se detectó la proteína ARTISt en otros tejidos además de los esteroideogénicos, se analizaron las isoformas de ARTISt y se comprobó que en hígado, en estado de ayuno, había un cambio en el número de las isoformas con respecto a las muestras controles. Ésta fue la primera evidencia que sugería la posibilidad de regulación de la proteína en otros tejidos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se pensó que la enzima podía estar regulada, ya sea hormonalmente, o por factores nutricionales en tejidos no esteroideogénicos (Finkielstein y col, 1996). Posteriormente, el grupo de Alexson encontró una gran inducción del ARNm de la proteína en hígado en estado de ayuno (Svensson y col, 1998).

El conjunto de estas evidencias señalan que la expresión de la proteína se regula, no sólo por proliferadores de peroxisomas, sino también por el estado nutricional del animal. Sin embargo, habíamos hallado que en tejido cardíaco los proliferadores de peroxisomas no tenían una influencia evidente sobre los niveles del ARNm de ARTISt en corazón. Nos propusimos entonces estudiar si este órgano era regulable o no por factores nutricionales.

Se analizaron muestras de ARN provenientes de corazones de ratas controles y de corazones de ratas sometidas a un ayuno de 48 horas. La Figura 24 muestra un gran incremento en la abundancia relativa del ARNm de ARTISt en las muestras provenientes de corazones de ratas ayunadas. En la misma figura se observan también las autorradiografías de muestras de ARN de hígado correspondiente a las mismas ratas, en donde el perfil es muy similar al que se observa en los carriles correspondientes a las muestras de corazón.



**FIGURA 24:** EFECTO DEL AYUNO SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE ARTIST EN TEJIDO HEPÁTICO Y CARDÍACO.

Un grupo de ratas fue ayunada por 48 hs (Ay), otro grupo fue alimentado con la dieta habitual *ad libitum* (C). 100 mg de tejido hepático y cardíaco de ambos grupos fueron homogeneizados en Trizol. 24 µg de ARN total de cada muestra fue analizado por Northern blot utilizando una sonda de 702 pb (panel superior) y una sonda que reconoce al 28S (panel del medio). En el panel inferior se muestra la relación entre las densidades de las bandas de 2,6 kb de ARTIST y la del 28S. En la Figura se muestra un ejemplo de tres experimentos independientes.

## ***DISCUSIÓN***

ARTIS<sub>t</sub> es una acil-CoA tioesterasa que ha sido aislada, purificada y clonada inicialmente a partir de tejidos esteroideogénicos. En estudios previos realizados en nuestro Laboratorio se estudió su función en estos tejidos (Paz y col, 1994; Finkielstein y col, 1996, 1998) y se propuso que la activación hormonal de ARTIS<sub>t</sub> regula la liberación de AA, que luego de su metabolización a leucotrienos aumenta la transcripción y traducción de StAR, para activar el paso limitante en la esteroideogénesis: el transporte de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna.

Estudios posteriores confirmaron que esta proteína también se encuentra en tejidos no esteroideogénicos. El objetivo de nuestro trabajo fue entonces estudiar si la actividad de ARTIS<sub>t</sub> en tejidos no esteroideogénicos estaba regulada hormonalmente, lo cual indicaría que esta enzima podría formar parte de un nuevo camino metabólico para la regulación de los niveles intracelulares de AA.

Como modelo de tejido no esteroideogénico se utilizó el tejido cardíaco. El AA es un compuesto que cumple numerosas funciones en corazón, su metabolismo es rápido y se convierte en otros derivados en respuesta a distintos estímulos, que juegan papeles importantes en las respuestas fisiológicas. En nuestro Laboratorio hemos detectado una alta expresión tanto de la proteína como del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> en tejido cardíaco. Este hecho ha sido descrito también por otros autores (Lindquist y col, 1998; Svensson y col, 1998).

Lo novedoso de este trabajo de Tesis es que se demostró que ARTIS<sub>t</sub> puede ser regulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, ya que se comprobó que la actividad de ARTIS<sub>t</sub> se incrementa por estimulación hormonal en tejido cardíaco. Como ha sido mencionado previamente, para determinar la bioactividad de ARTIS<sub>t</sub> en glándula adrenal se utilizó un ensayo descrito por Neher y col (Neher

y col, 1982) que permite detectar factores esteroideogénicos ACTH dependientes en distintos compartimientos subcelulares.

Para ello se puso a punto un bioensayo que permitiera determinar si luego del estímulo hormonal, la enzima ARTIS<sub>t</sub> se encontraba activada. Utilizando entonces un ensayo de recombinación de fracciones heterólogas *in vitro*, se observó una producción neta de progesterona al utilizar citosoles cardíacos estimulados con isoproterenol. Esto sugirió la existencia de factores cardíacos capaces de interaccionar con las mitocondrias, los microsomas y núcleos controles de adrenal para producir la estimulación de la esteroideogénesis.

El hecho que la perfusión del miocardio con el  $\beta$ -bloqueante propranolol antes de la perfusión con isoproterenol produjera una inhibición de la respuesta en el ensayo de recombinación heterólogo demuestra que el mecanismo por el cual isoproterenol activa la proteína ARTIS<sub>t</sub> en corazón está mediado por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

En tejidos esteroideogénicos, el AA se debe convertir en leucotrienos para que la esteroideogénesis tenga lugar. Este efecto fue comprobado cuando inhibidores de la formación de leucotrienos inhibieron el efecto de ARTIS<sub>t</sub> en corazón. En corazón, el AA producido por ARTIS<sub>t</sub> también se metaboliza al menos en parte a leucotrienos, ya que cuando se utilizaron los microsomas cardíacos también fue posible aumentar la síntesis de esteroides.

La estimulación observada en el ensayo de recombinación heterólogo se corresponde con un aumento de la actividad de acil-CoA tioesterasa, ya que anticuerpos dirigidos contra el motivo serina-lipasa y contra el grupo cisteína, que caracterizan a esta familia de tioesterasas produjeron una bloqueo de la

respuesta estimuladora. Los citosoles que fueron incubados con los anticuerpos antipeptidos de ARTIST: anti-G11K, anti-FR7, anti-A10A y anti-FG7 mostraron una inhibición significativa en la estimulación de la producción de progesterona. En cambio, los citosoles provenientes de corazones activados que habían sido preincubados con suero normal de conejo y el anticuerpo anti-V15Q no mostraron diferencia significativa con respecto a la estimulación de la esteroidogénesis.

Es interesante analizar la estructura de los péptidos contra los cuales fueron creados estos anticuerpos. En la Figura 25 se observa la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADN<sub>c</sub> de ARTIST. En ella se remarcan las secuencias de aminoácidos que son reconocidos por los anticuerpos que bloquean la actividad de la enzima. ARTIST contiene un sitio que es similar al motivo general que caracteriza al sitio activo de las lipasas. De acuerdo al *Prosite sequence motif database*, el péptido G11K estaría involucrado en el sitio activo de la enzima, ya que posee un motivo serina lipasa que posee la siguiente secuencia de aminoácidos: Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly.

En la Figura 26 se muestran las alternativas sugeridas en las secuencias consenso alineadas con la probable secuencia activa de ARTIST. Se ha propuesto que el residuo nucleofílico serina presente en la posición 273 le confiere las propiedades hidrofóbicas que se necesitan para la unión al sustrato. Este motivo podría estar involucrado en la formación del intermediario S-éster con el sustrato durante la reacción de transferencia del acilo (Falany y col, 1994; Furutani y col, 1995). Tradicionalmente, las acil-CoA tioesterasas - entre ellas las tioesterasas I y II, que están involucradas en la terminación de la síntesis de ácidos grasos - habían sido calificadas como serín-esterasas, ya que eran sensibles a los inhibidores de estas enzimas (por ejemplo: diisopropilfluorofosfato o fenilmetilsulfonil fluoruro) (Randhawa y col, 1987). Sin

embargo esta nueva familia de tioesterasas no es inhibida por estos agentes, lo que sugiere diferencias estructurales en los sitios activos de estas tioesterasas (Svensson y col, 1995; Lindquist y col, 1998).

El péptido FG7 pertenece a la porción del extremo amino terminal de la proteína. Muy próxima a la secuencia de este péptido, se encuentra una cisteína en la posición 55 (Figura 25). Se ha sugerido que este aminoácido estaría involucrado en el mecanismo de acción de la enzima ya que se ha descrito que la actividad de esta familia de acil-CoA tioesterasas, incluida la actividad de ARTIS cardíaca (datos no publicados) no es afectada por inhibidores de serinesterasas pero sí por agentes de grupos reactivos tioles, como el p-cloromercuribenzoato (Yamada y col, 1994; Svensson y col, 1995). Este comportamiento con respecto a los inhibidores se asemeja al de la tioesterasa de palmitoil-proteína y al de la tioesterasa CTE-II (Camp y Hofmann, 1993; Engberg y col, 1997), lo que podría representar en conjunto un nuevo tipo de mecanismo para la hidrólisis del tioéster.

Resumiendo: el anticuerpo anti-G11K reconoce el motivo serina lipasa de la enzima que está incluido en el sitio activo; el anticuerpo anti-FG7 reconoce la porción del extremo amino terminal, que posee una cisteína que también está propuesta como integrante del sitio activo. Los anticuerpos anti-FR7 y anti-A10A, que también bloquearon la actividad de la enzima, no poseen al momento un motivo activo identificable.

```

1 M V A S S F A V L R A S R L C Q W G W K S W T Q L S G P P P
31 L S T G G R T T F A R T N A T L S L E P G S R S C W D E P L
61 S I T V R G L A P E Q P V T L R A A L R D E K G A L F R A H
91 A R Y R A D A G G E L D L A R A P A L G G S F T G L E P M G
121 L I W A M E P E R P L W R L V K R D V Q K P Y V V E L E V L
151 D G H E P D G G Q R L A Q A V H E R H F M A P G V R R V P V
181 R D G R V R A T L F L P P E P G P F P E I I D L F G V G G G
211 L L E Y R A S L L A G K G F A V M A L A Y Y N Y D D L P K T
241 M E T M R I E Y F E E A V N Y L R G H P E V K G P G I G L L
271 G I S K G G E L G L A M A S F L K G I T A A V V I N G S V A
301 A V G N T V C Y K D E T I P P V S L L R D K V K M T K D G L
331 L D V V E A L Q S P L V D K K S F I P V E R S D T T F L F L
361 V G Q D D H N W K S E F Y A R E A S K R L Q A H G K E K P Q
391 I I C Y P E A G H Y I E P P Y F P L C S A G M H L L V G A N
421 I T F G G E P K P H S V A Q L D A W Q Q L Q T F F H K Q L S
451 G K S
    
```

**FIGURA 25:** SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ARTIST.

En color se encuentran marcados los péptidos G11K, FG7 y FR7.

**MOTIVO SERINA LIPASA**

Consenso	(LIV)	X	(LIVFY)	(LIVST)	G	(HYWV)	S	X	G	(GSTAC)
G11K	I	G	L	L	G	I	S	K	G	G
Posición	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276

**FIGURA 26:** MOTIVO SERINA LIPASA

Secuencia consenso para el motivo serina lipasa, alineado con el péptido G11K, involucrado en el sitio activo de la enzima.

El conjunto de los resultados hasta ahora mencionados (el ensayo de recombinación de fracciones subcelulares heterólogas, el bloqueo por anticuerpos antipeptidos de ARTIS<sub>t</sub>, la incubación con inhibidores de la metabolización del AA), demuestran que en tejido cardíaco la proteína ARTIS<sub>t</sub> es regulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y es capaz de actuar a semejanza de la proteína ARTIS<sub>t</sub> de adrenal.

La estimulación  $\beta$ -adrenérgica, no sólo incrementa la actividad enzimática de ARTIS<sub>t</sub> en tejido cardíaco, sino que también regula los niveles de ARNm de la proteína. Se encontró un aumento en la abundancia del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> correspondiente a los corazones estimulados con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol. El mismo efecto fue observado por perfusión de los corazones con el análogo permeable 8-Br AMPc. El antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol produjo un bloqueo de la respuesta indicando que el aumento en el nivel del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> inducido por isoproterenol, está mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

En condiciones basales, el tejido cardíaco presenta dos transcritos de ARTIS<sub>t</sub>: uno de 2,6 kb; que corresponde a la isoforma mitocondrial y otro minoritario de 1,8 kb; que corresponde a la isoforma citosólica. Este último se detecta con muy baja intensidad, aún luego de la estimulación adrenérgica.

Con el objetivo de estudiar si el aumento en la abundancia del ARNm de ARTIS<sub>t</sub> era debido a un aumento en la transcripción, se investigó el efecto de un inhibidor de este proceso sobre la expresión del ARNm de ARTIS<sub>t</sub>. Se observó una disminución en la abundancia del transcrito, lo que sugiere que el aumento en los niveles del transcrito de ARTIS<sub>t</sub> por estimulación del tejido cardíaco con isoproterenol, es por lo menos en parte, debido a un aumento en la transcripción.

Además de las múltiples funciones regulatorias ya señaladas de los agonistas adrenérgicos en el tejido cardíaco, numerosos grupos de investigación han estudiado la regulación de la expresión de genes por estimulación  $\beta$ -adrenérgica. Se ha descrito en la literatura una gran variedad de procesos activados por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Entre otros, se ha estudiado la regulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Collins y col, 1991,1992; Dangel y col, 1996), la regulación de los canales de  $Ca^{++}$ , de los canales intercambiadores de  $Na^+/Ca^{++}$  (Golden y col, 2000), de la proteína de unión al elemento respondedor de AMPc (CREB) (Muller y col, 1995), así como también cambios en la expresión de proteínas que participan en procesos metabólicos (van Bilsen y col, 1998).

En algunos de estos trabajos se señala que la expresión de estos genes se regula a tiempos relativamente cortos. Han sido descritos efectos tempranos del isoproterenol asociados a mecanismos de activación de la transcripción del gen de la hexoquinasa II (Osawa y col. 1995), a la regulación de la transcripción del elemento respondedor de AMPc (CREB) en miocitos cardíacos (Goldspink y col, 1994), a la expresión del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Collins y col, 1989) y al inotropismo positivo debido a efectos genómicos desencadenados por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Rubin y col, 1999). Nuestros resultados coinciden con los de estos autores, ya que confirman la capacidad del isoproterenol - vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos y aumento del AMPc - de aumentar los niveles de ARNm de ARTIST a tiempos cortos.

Hemos encontrado también que el ARNm de ARTIST está regulado por condiciones nutricionales en tejido cardíaco. El estado de ayuno provocó un aumento en la abundancia del ARNm de ARTIST en corazón, semejante al observado en tejido hepático.

Si bien se había descrito previamente que las acil-CoA tioesterasas del tejido hepático, un tejido no esteroideogénico, eran fuertemente inducidas por proliferadores de peroxisomas, en corazón no se observaron diferencias en la abundancia del ARNm de ARTIST entre las muestras provenientes de ratas controles y de ratas tratadas con proliferadores de peroxisomas. Por otra parte, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que en glándula adrenal tampoco había regulación del ARNm de ARTIST por proliferadores de peroxisomas (datos no publicados). Paralelamente a la realización de estos experimentos, el grupo de Alexson analizó la expresión del ARNm de CTE-I y MTE-I en varios tejidos provenientes de ratas controles y ratas tratadas con proliferadores de peroxisomas durante 14 días utilizando una sonda de 242 pb. Los resultados que obtienen son similares a los descritos en esta sección, y concluyen que la enzima en corazón se expresa constitutivamente (Svensson y col, 1998).

Si bien se ha detectado la existencia de varias enzimas liberadoras de AA en tejido cardíaco, al presente no se ha descrito el sistema que está involucrado en la liberación de AA por estimulación  $\beta$ -adrenérgica, es por eso que la importancia de esta Tesis radica en que se describe un nuevo mecanismo de liberación de AA por estimulación  $\beta$ -adrenérgica en corazón. Por lo tanto, se abren nuevas perspectivas que permitan precisar el rol de ARTIST en tejido cardíaco y estudiar la relación entre esta enzima y la patofisiología cardíaca.

Como se ha detallado en la Introducción, en tejidos esteroideogénicos se ha descrito un nuevo camino de liberación de AA en compartimientos específicos de la célula para que pueda metabolizarse a leucotrienos, los cuales son los encargados de regular la activación de genes. Este sistema está compuesto por un conjunto de proteínas: una sintetasa específica para la síntesis de araquidonoil-CoA (ACS4), una proteína transportadora de acil-CoAs

(DBI/ACBP), que tiene su receptor en mitocondria (PBR), y la acil-CoA tioesterasa (ARTIST), que es la encargada de utilizar como sustrato al araquidonoil-CoA para liberar AA. Todas las proteínas mencionadas se encuentran reguladas hormonalmente.

Este sistema es imprescindible en todos los tejidos esteroideogénicos para que se cumpla la acción hormonal y es independiente de la Fosfolipasa A2. Una de las preguntas que surge de este sistema es porqué el AA libre, quizás proveniente de fosfolípidos de membrana o de araquidonato de colesterol debe reesterificarse a acil-CoA para luego ser liberado. Dadas las características de una acil-CoA sintetasa y una acil-CoA tioesterasa específicas y del transportador de acil-CoAs, se postula que este tipo de mecanismo serviría para regular la liberación de AA en sitios específicos de la célula secuestrando el AA en forma de araquidonoil-CoA para ser transportado al sitio de acción de la acil-CoA tioesterasa, mecanismo controlado por acción hormonal.

El trabajo presentado sobre la participación de ARTIST en tejido cardíaco abre la hipótesis que éste podría ser un mecanismo generalizado en todos aquellos tejidos que requieran la regulación hormonal de la liberación de AA en sitios específicos. El corazón es un tejido donde el AA es intermediario para la síntesis, entre otros, de leucotrienos y prostaglandinas, eventos que están regulados hormonalmente. Es por ello que creemos que la liberación de AA observada en tejidos esteroideogénicos podría ser aplicado también a corazón y abre la posibilidad de buscar una acil-CoA sintetasa cardíaca, lo que significa que el sistema regulador de los niveles intracelulares de AA podría estar ubicado en varios tejidos, demostrándose así que la regulación de esas entidades sería un mecanismo general.

## ***CONCLUSIONES***

Los resultados descritos en este trabajo convergen en otorgar a la proteína ARTIST, que ya habíamos estudiado en tejidos esteroideogénicos, un papel más amplio en el mecanismo de transducción de señales.

La presencia de la proteína ARTIST fue detectada en diferentes tejidos no esteroideogénicos, revelándose especialmente una señal intensa en corazón y riñón. Este resultado nos motivó para investigar el rol de ARTIST en tejidos no esteroideogénicos. En esta Tesis se describe principalmente el estudio de la regulación de la bioactividad y la expresión del ARNm de ARTIST en tejido cardíaco.

Los resultados de los experimentos realizados nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Con el objetivo de medir la bioactividad de la enzima ARTIST se puso a punto un ensayo de recombinación de fracciones heterólogas *in vitro* en el cual se midió la capacidad de los extractos cardíacos de estimular la síntesis de progesterona en las mitocondrias de adrenales controles en presencia de la fracción microsomal y nuclear. Tanto el citosol como el sobrenadante post-mitocondrial provenientes de corazones perfundidos con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol demostraron activar la producción de progesterona de la mitocondrias de adrenales controles en los ensayos de recombinación heterólogos.

- Este proceso está mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ya que la respuesta estimuladora inducida por isoproterenol fue bloqueada por la perfusión previa con el antagonista propranolol.

- Isoproterenol demostró producir un efecto dosis-respuesta con respecto a la estimulación observada en un rango de concentraciones entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M. En la respuesta observada *in vitro* está involucrada la liberación y metabolización del AA, dado que se produjo una inhibición en la respuesta estimuladora producida por isoproterenol cuando el ensayo de recombinación heterólogo se hacía en ausencia de microsomas, o éstos se incubaban con NDGA, un inhibidor de la liberación y metabolización del AA.

- Se comprobó que ARTIST cardíaca estimulada por isoproterenol es la responsable de la respuesta observada en adrenal ya que los anticuerpos antipeptidos inhibieron la capacidad del citosol de producir la estimulación en mitocondrias de adrenal.

- Nuestros resultados indican que los niveles del ARNm de ARTIST pueden ser regulados por isoproterenol en un mecanismo mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos y bajo el control del segundo mensajero AMPc. Esta regulación es dependiente del tiempo de perfusión.

- La administración de actinomicina D antes de la perfusión cardíaca con isoproterenol abolió el efecto causado por éste, demostrando que los aumentos en la abundancia del ARNm de ARTIST son, al menos, debidos a un aumento en la transcripción.

- Por otra parte, la abundancia del ARN mensajero de ARTIST aumentó cuando las ratas fueron sometidas a ayuno pero no cuando fueron tratadas con proliferadores de peroxisomas, sugiriendo un mecanismo de regulación distinto al descrito en tejido hepático.

Por todo lo expuesto en este trabajo se desprende que la proteína ARTIST puede cumplir, al menos en tejido cardíaco, un rol semejante al ya estudiado en tejidos esteroideogénicos, es decir el de controlar los niveles intracelulares de AA luego de un estímulo hormonal. Dado que en tejidos esteroideogénicos el AA liberado por esta vía regula la transcripción de genes, el rol de ARTIST cardíaco podría estar localizado también a nivel transcripcional.

En la presente Tesis hemos descripto la existencia de una nueva vía para la liberación de AA en corazón. Visto y considerando la importancia que tienen tanto este producto como sus metabolitos en la patofisiología cardíaca resulta de sumo interés profundizar el estudio de este nuevo sistema de regulación intracelular de los niveles de AA.



## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Abayasekara DR, Band AM y Cooke BA (1990) *Moll Cell Endocrinol* **70**:147-153.
- Abayasekara DR, Ford SL, Persaud SJ y Jones PM (1996) *J Endocrinol* **150**:213-221.
- Alberta JA, Epstein LF, Pon LA y Orme-Johnson NR (1989) *J Biol Chem* **264**:2368-2372.
- Ahlquist RP (1948) *Am J Physiol* **153**:586-600.
- Alexson SEH, Mentlein R, Wernstedt C y Hellman U (1993) *Eur J Biochem* **214**: 719-727.
- Bakker GH, Hoogerbrugge JW, Rommerts FF y van der Molen HJ (1983) *FEBS Lett* **161(1)**:33-36.
- Barger G y Dale HH (1910) *J Physiol (Lond)* **41**:19-59.
- Beall R y Sayers G (1972) *Arch Biochem Biophys* **148**:70-76.
- Bell R y Burns D (1991) *J Biol Chem* **266**:4661-4664.
- Berlan M, Galitzky J, Montastruc JL (1995) *Fundam Clin Pharmacol* **9(3)**: 234-239.
- Berridge MJ (1993) *Nature* **365**:388-389.
- Best y Taylor (1981) *Physiological Basis of Medical Practice*, 10<sup>a</sup> ed Editores:Williams y Wilkins, Baltimore, London
- Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ y Gotschilch LC (1984) *Anal Biochem* **136**:175-178.
- Bose HS, Sugawara T, Strauss JF y Miller WL (1996) *N Engl J Med* **335(25)**:1870-1878.
- Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M y Wahli W (1996) *Endocrinology* **137**:354-366.
- Breitbart E, Sofer Y, Shainberg A y Grossman S (1996) *FEBS Letters* **395**:148-152.
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W y Rasmussen R (1989) *Mol Pharmacol* **35(3)**:295-303.
- Brown AM y Birnbaumer L (1988) *Am J Physiol* **254H**:401-410.
- Bylund DB (1992) *FASEB J* **6(3)**:832-839.
- Camp LA y Hofmann SL (1993) *J Biol Chem* **268(30)**:22566-22574.
- Catt K, Dufau M y Tsuruhara T (1972) *J Clin Endocrinol* **34**:123-132.

- Clark BJ, Wells J, King SR y Stocco DM (1994) *J Biol Chem* **269**:28314-28322.
- Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG y Lefkowitz RJ (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86 (113)**:4853-4857.
- Collins S, Caron MG y Lefkowitz RJ (1992) *Trends Biochem Sci* **17**:37-39.
- Cooke BA, Lindh L y Janszen F (1976) *Biochem J* **160**:439-446.
- Cooke BA, Dix C, Maggee-Brown R, Janszen F y van der Molen HJ (1981) *Adv Cyclic Nucleotide Res* **14**:593-597.
- Cooke BA, Dirami G, Chaudry L, Choi MSK, Abayasekara DRE y Phipp L (1991) *J Steroid Biochem Molec Biol* **40**: 465-471.
- Corbin JD, Sugden PH, West L, Flockhart DA, Lincoln TM y McCarthy D (1978) *J Biol Chem* **253**:3997-4003.
- Cornejo Maciel F, Paz C y Podestá EJ (1999) Comunicación presentada en la XLIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica *Medicina* **59(5/2)**:563.
- Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng T, Chen E, Waterfield M, Francke U y Ullrich A (1986) *Science* **233**:859-866.
- Crivello JF y Jefcoate CR (1980) *J Biol Chem* **255**:8144-8151.
- Cho YY, Kang MJ, Ogawa S, Yamashita Y, Fujino T y Yamamoto TT (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **274(3)**:741-745.
- Chomczynski P y Sacchi N (1987) *Anal Biochem* **162**:156-159.
- Church DJ, Braconi S, Vallotton MB y Lang U (1993) *Biochem J* **290 ( Pt 2)**:477-82.
- Churchill PF y Kimura T (1979) *J Biol Chem* **254**:10443-10448.
- Dangel V, Giray J, Ratge D y Wisser H (1996) *Biochem J* **317**:925-931.
- Davis JO (1975) en *Handbook of Physiology (Blaschko, Sayer y Smith eds.) American Physiological Society* 6, sección 7:77-106.
- Debetto P, Cargnelli G, Antolini M, Bova S, Trevisi L, Varotto R y Luciani S (1999) *Biochem Pharmacol* **58**:1437-1446.
- De Windt LJ, Willemsen PH, Popping S, Van der Vusse GJ, Reneman RS y Van Bilsen M (1997) *J Mol Cell Cardiol* **29(8)**:2095-106.

- 
- Dix C, Habberfield A, Sullivan M y Cooke B (1984) *Biochem J* **219**:529-537.
  - Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) *Annu Rev Biochem* **60**:653-688.
  - Dufau ML, Podestá EJ y Catt KJ (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:1272-1275.
  - Dusting GJ, Chapple DJ, Hughes R, Moncada S y Vane JR (1978) *Cardiovas Res* **12**:720-730.
  - Elliot M, Goodfriend T y Jefcoate C (1993) *Endocrinology* **133**:1669-1677.
  - Engberg ST, Aoyama T, Alexson SEH, Hashimoto T y Svensson LT (1997) *Biochem J* **323**:525-531.
  - Epstein LF y Orme-Johnson NR (1991-a) *Mol Cell Endocrinol* **81**:113-126.
  - Epstein LF y Orme-Johnson NR (1991-b) *J Biol Chem* **266**:19739-19745.
  - Falany C, Johnson M, Barnes S y Diasio R (1994) *J Biol Chem* **269**:19375-19379.
  - Ferguson JJ (1962) *Biochim Biophys Acta* **57**:616-617.
  - Ferguson JJ (1963) *J Biol Chem* **238**:2754-2759.
  - Finkielstein CV, Cymeryng C, Paz C, Neuman I, Dada L, Cornejo Maciel F, Mele PG, Mendez CF, Maloberti P, Solano AR, Schimmer BP y Podestá EJ (1996) *Endocrine Research* **22(4)**:521-532.
  - Finkielstein CV, Maloberti P, Mendez CF, Paz C, Cornejo Maciel F, Cymeryng CB, Neuman I, Dada L, Mele PG, Solano AR y Podestá EJ (1998) *Eur J Biochem* **256**:60-66.
  - Forman BM, Chen J y Evans RM (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:4312-4317.
  - Fraser R, Brown J, Lever A, Mason PA y Robertson JIS (1979) *Clin Sci* **56**:389-399.
  - Furutani M, Arai S, Higashitsuji M, Mise M, Fukumoto M, Takano S, Nakashima H, Imamura M y Fujita J (1995) *Biochem J* **311**:203-208.
  - Garren L, Ney RI y Davis WW (1965) *Proc Natl Acad Sci USA* **53**:1443-1450.
  - Garren L, Davis WW y Crocco R (1966) *Science* **152**:1386-1388.
  - Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E y Gustafsson JA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1440-1444.
  - Golden KL, Fan QI, Chen B, Ren J, O'Connor J y Marsh JD (2000) *J Mol Cell Cardiol*

**32(4):611-620.**

- Goldspink PH y Russell B (1994) *Circ Res* **74(6):1042-1049.**
- González Reyes J, Santana P, González Robaina I, Cabrera Oliva J, Estévez F, Hernández I, López Blanco F, Quintana Aguiar J, Fanjul LF y Ruiz de Galarreta CM (1997) *J Endocrinol* **152(1):131-139.**
- Goodman y Gilman (1996) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª ed Editores:Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A..
- Grahame-Smith D, Bulcher R, Ney R y Sutherland E (1967) *J Biol Chem* **242:5535-5541.**
- Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Kupkel D, Bennet CD y Costa E (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80:3531-3533.**
- Han JD y Rubin CS (1996) *J Biol Chem* **271:29211-29215.**
- Hanukoglu I y Hanukoglu Z (1986) *Eur J Biochem* **157:27-31.**
- Hauffa PT, Miller WL, Grumbach Conte FA y Kaplan SL (1985) *Clin Endocrinol* **23:481-493.**
- Hirai A, Tahara K, Tamura Y, Saito H, Terano T y Yoshida S (1985) *Prostaglandins* **30:749-767.**
- Huang JM, Xian H y Bacaner M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89(14):6452-6456.**
- Hunt MC, Nousiainen SEB, Huttunen MK, Orii KE, Svensson LT y Alexson SEH (1999) *J Biol Chem* **274:34317-34326.**
- Hunt MC, Lindquist PJG, Peters JM, Gonzalez FJ, Diczfalusy U y Svensson LT (2000) *Journal of Lipid Research* **41:814-822.**
- Isseman I y Green S (1990) *Nature* **347:645-650.**
- Jefcoate CR, Di Bartolomeos MJ, Williams CA y McNamara BC (1987) *J Steroid Biochem* **27:721-729.**
- Jones DB, Marante D, Williams BC y Edwards CRW (1987) *J Endocrinol* **112:253-258.**
- Kahn MT y Malik KU (1982) *Eur J Pharmacol* **78:2113-2118.**
- Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M y Strauss JF (1998) *J Biol Chem* **273(41):26285-26288.**

- Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H y Yamamoto TT (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:2880-2884.
- Kahnt F, Milani A, Steffen H y Neher R (1974) *Eur J Biochem* **44**:243-250.
- Karaboyas GC y Koritz BS (1965) *Biochemistry* **4**:462-468.
- Kastner P, Mark M y Chambon P (1995) *Cell* **83**:859-869.
- Kennelly PJ y Krebs EG (1991) *J Biol Chem* **266**:15555-15558.
- Kim D y Clapham DE (1989) *Science* **244**:1174-1176.
- Kitamura T, Onishi K, Dohi K, Okinaka T, Isaka N y Nakano T (2000) *J Cardiovasc Pharmacol* **35(5)**: 786-790.
- Kliewer SA, Lehmann JM, Milburn MV y Willson TM (1999) *Recent Prog Horm Res* **54**:345-368.
- Kojima I, Kojima K, Kreutter D y Rasmussen H (1984) *J Biol Chem* **259**:14448-14457.
- Kojima I, Kojima K y Rasmussen H (1985-a) *Endocrinology* **117**:1057-1066.
- Kojima I, Kojima K y Rasmussen H (1985-b) *J Biol Chem* **260**:4248-4256.
- Kojima I, Shibata H y Ogata E (1986) *Biochem J* **237**:253-258.
- Krebs EG y Beavo JA (1979) *Ann Rev Biochem* **43**:923-59.
- Krebs EG (1985) *Biochem Soc Trans* **13**:813-820.
- Krueger RJ y Orme-Johnson NR (1983) *J Biol Chem* **258**:10159-10167.
- Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB y Steinberg SF (1995) *Circ Res* **76**:40-52.
- Laemmli UK (1970) *Nature* **227**:680-685.
- Lambeth JD, Seybert DW y Kamin H (1979) *J Biol Chem* **254**:7255-7264.
- Langer SZ y Lehmann J (1988) *Catecholamines I - Handbook of Experimental Pharmacology* **90**:419-507 Editores: Springer y Verlag.
- Lanier SM y Malik KU (1985) *J Cardiovasc Pharmacol* **7**:653-659.
- Lee HL, Shangold GA, Larsen AL y Schreiber JR (1989) *Fertil Steril* **52(6)**:958-964.
- Lefkowitz RJ, Hausdorff WP y Caron MG (1990) *Trends Pharmacol Sci* **11**:190-194.
- Levitt D (1990) *Curr Opin Cell Biol* **2**:689- 694.
- Lin D, Gitelman SE, Saenger P y Miller WL (1991) *J Clin Invest* **88**:1955-1962.
- Lin D, Chang YJ, Strauss III JF y Miller WL (1993) *Genomics* **18**:643-650.

- Lin D, Sugawara T, Strauss III JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A y Miller WL (1995) *Science* **267**:1828-1831.
- Lindquist LG, Svensson LT y Alexson SEH (1998) *Eur J Biochem* **251**:631-640.
- Liscum L y Dahl NK (1992) *J Lipid Res* **33**:1239-1254.
- Livesey SA, Kemp BE, Re CA, Partridge NC y Martin TJ (1988) *J Biol Chem* **257**:14983-14987.
- Lock EA, Mitchell AM y Elcombe CR (1989) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**:145-163.
- López-Ruiz MP, Choi MSK, Rose M, West AP y Cooke BA (1992) *Endocrinol* **130**:1122-1130.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) *J Biol Chem* **193**:265-273.
- Malik KU y Sehic E (1990) *Ann NY Acad Sci* **604**:222-236.
- Maloberti P, Mele PG, Neuman I, Cornejo Maciel F, Cano F, Bey P y Podestá EJ (2000) *Endocrine Research* **26(4)**:653-662.
- Massey KD, Minnich BN y Burt JM (1992) *Am J Physiol* **263**:C494-501.
- Mannella CA, Forte M y Colombini MJ (1992) *Bioenerg Biomembr* **24**:7-19.
- McEnery MW, Snowman AM, Trittilletti RR y Snyder SH (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:3170-3174.
- McGiff JC (1991) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **31**:339-369.
- McHowat J y Creer MH (1998) *Lipids* **33(12)**:1203-1212.
- McHowat J y Liu S (1997) *Am J Physiol* **272(2 Pt1)**:C450-456.
- Mele PG, Dada LA, Paz C, Cymeryng CB, Cornejo Maciel F, Neuman I, Finkielstein CV, Mendez CF y Podestá EJ (1996) *Biochim Biophys Acta* **1310**:260-268.
- Mele PG, Dada LA, Paz C, Neuman I, Cymeryng CB, Mendez CF, Finkielstein CV, Cornejo Maciel F y Podestá EJ (1997) *Endocrine Research* **23**:15-26.
- Mellon PL, Clegg CH, Correl LA y McNight G (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4887-4891.
- Mikami K, Omura M, Tamura Y y Yoshida S (1990) *J Endocrinol* **125**:89-96.
- Miyazawa S, Furuta S y Hashimoto T (1981) *Eur J Biochem* **117**:425-430.
- Moffat MP, Ward CA, Bend JR, Mock T, Farhangkhoe P y Karmazyn M (1993) *Am J*

*Physiol* **264**:H1154-160.

- Morris HR, Taylor GW, Jones CM, Piper PJ, Samhoun MN y Tippins JR (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:4838-4842.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT y Cone RD (1992) *Science* **257**:1248-1251.
- Muller FU, Boknik P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U y Walter A (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **215(3)**:1043-1049.
- Nakamura F, Minshall RD, Le Breton GC y Rabito SF (1996) *Hypertension* **28(3)**:444-449.
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morison AR y Lefkowitz JB (1986) *Annu Rev Biochem* **55**:69-102.
- Neher R, Milani A, Solano A y Podestá EJ (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:1727-1731.
- Neuman I, Lisdero C, Finkielstein C, Maloberti P, Mendez CF, Poderoso JJ y Podestá EJ (1999) *Biochim Biophys Acta* **1451**:101-108.
- Neuman I, Maloberti P, Lisdero C, Poderoso JJ y Podestá EJ (2000) Poster presentado en The Endocrine Society 82<sup>nd</sup> Annual Meeting realizado en Toronto, Canadá.
- Ney RL, Hochella N, Grahame-Smith D, Dexter R y Bulcher R (1969) *J Clin Invest* **48**:1733-1739.
- Nishikawa T, Omura M, Noda M y Yoshida S (1994) *J Biochem* **116**:833-837.
- Nishisuka Y (1988) *Nature* **334**:661-665.
- Osawa H, Printz RL, Whitesell RR y Granner DK (1995) *Diabetes* **44(12)**:1426-1432.
- Papadopoulos V (1993) *Endocrine Rev* **14**:222-240.
- Paz C, Dada LA, Cornejo Maciel MF, Mele PG, Cymeryng CB, Neuman I, Mendez CF, Finkielstein CV, Solano AR, Park M, Fischer WH, Towbin H, Scartazzini R y Podestá EJ (1994) *Eur J Biochem* **224**:709-716.
- Paz C, Cornejo Maciel MF, Mendez CF y Podestá EJ (1999) *Eur J Biochem* **265**:911-918.
- Poderoso JJ, Fernández S, Carreras MC, Del Bosco CG y Boveris A (1995) *Crit Care Med* **23**:1726-1733.

- Poderoso C, Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Paz C y Podestá EJ (2000) Comunicación presentada en la XLV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica *Medicina* **60(5/2)**:804.
- Podestá EJ, Dufau ML y Catt K (1976-a) *Molec Cell Endocrinol* **5**:109-122.
- Podestá EJ, Dufau ML y Catt K (1976-b) *FEBS Letts* **70**:212-216.
- Podestá EJ, Dufau ML, Solano A y Catt K (1978) *J Biol Chem* **235**:8994-9001.
- Podestá EJ, Milani A, Steffen H y Neher R (1979) *Biochem J* **180**:355-363.
- Podestá EJ, Milani A, Steffen H y Neher R (1980) *Biochem J* **186**:391-397.
- Pon LA, Hartigan JA y Orme Johnson NR (1986) *J Biol Chem* **261**:13309-13316.
- Privalle CT, Crivello JF y Jefcoate CR (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:702-706.
- Quin S, Cornwall M y Williams G (1987) *Endocrinology* **120**:903-914.
- Raikhinstein M, Zohar M y Hanukoglu I (1994) *Biochim Biophys Acta* **1220**:329-332.
- Ramachandran J (1984) *Endocr Res* **10**:347-363.
- Randhawa ZI, Naggert J, Blacher RW y Smith S (1987) *Eur J Biochem* **162(3)**:577-581.
- Reddy JK y Lalwaani ND (1983) *Crit Rev Toxicol* **12**:1-58.
- Rocchi S, Gaillard I, van Obberghen E, Chambaz EM y Vilgrain I (2000) *Biochem J* **352**:483-490.
- Rodbel M, Birmbaumer L, Pohl S y Krans HMJ (1971) *J Biol Chem* **246**:1872-1882.
- Ruan Y, Kan H y Malik KU (1996-a) *J Pharmacol Exp Ther* **278**:482-289.
- Ruan Y, Kan H, Cano C y Malik KU (1996-b) *Am J Physiol* **271**:E556-E562.
- Rubin JM, Hidalgo A, García del Boto MJ y Sánchez M (1999) *Life Sciences* **45(5)**:565-72.
- Saenger P, Klonari Z, Black SM, Compagnone N, Mellon SH, Fleischer A, Abrams CAL, Shackelton CHL y Miller WL (1995) *J Clin Endocrinol Metab* **80**:200-205.
- Sala G, Hayashi K, Catt KJ y Dufau ML (1979) *J Biol Chem* **254**:3861-3865.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y e Inagami T (1991) *Nature* **351**:230-233.
- Sayed SB, Whitehouse BJ y Jones PM (1997) *J Endocrinol* **154**:449-458.
- Shaffer JE y Malik KU (1982) *J Pharmacol Exp Ther* **223(3)**:729-735.

- Schimmer BP, Ueda y Sato GH (1968) *Biochem Biophys Res Commun* **32**:806-810.
- Schror K (1993) *Arzneimittelforschung* **43(2A)**:236-41.
- Schultz R, Pelto-Huikko M y Atho H (1992) *Endocrinology* **130**:3200-3206.
- Segaloff D y Ascoli M (1993) *Endocr Rev* **14**:324-347.
- Seybert DW, Lancaster JR, Lambeth JD y Kamin H (1979) *J Biol Chem* **254**:12088-12098.
- Shoonjans K, Staels B y Auwers JJ (1996) *Lipid Res* **37**:907-925.
- Simpson ER y Boyd GS (1966) *Biochem Biophys Res Commun* **24**:10-17.
- Simpson ER y Boyd GS (1967) *J Biochem* **2**:275-285.
- Simpson ER, McCarthy JL y Peterson JA (1979) *J Biol Chem* **253**:3135-3139.
- Smith SH, Kramer MF, Reis I, Bishop SP e Ingwall JS (1990) *Circ Res* **67**:1334-1344.
- Solano AR, Dada LA, Sardaños ML, Sánchez ML y Podestá EJ (1987) *J Steroid Biochem* **27**:745-751.
- Solano AR, Dada LA y Podestá EJ (1988) *J Mol Endocr* **1**:147-154.
- Stocco DM y Kilgore MW (1988) *Biochem J* **249**:95-103.
- Stocco DM y Clark BJ (1996) *Endocrine Reviews* **17**:221-244.
- Stocco DM (2000) *J Endocrinol* **164**:247-253.
- Stryer L (1995) *Biochemistry* (fourth edition) WH Freeman and Company New York-Pag 851.
- Sullivan MHF y Cooke BA (1985) *Biochem J* **232**:55-59.
- Sullivan MHF y Cooke BA (1986) *Biochem J* **236**:45-51.
- Sutherland EW y Rall TW (1958) *J Biol Chem* **232**:1077.
- Svensson LT, Wilcke M y Alexson SEH (1995) *Eur J Biochem* **230**:813-820.
- Svensson LT, Engberg ST, Aoyama T, Usuda N, Alexson SEH y Hashimoto T (1998) *Biochem J* **329**:601-608.
- Tamura Y, Hirai K, Tahara K, Terano T y Yoshida S (1987) En: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res* (Samuelsson, Paoletti y Ramwell, editores) Raven Press, New York **17**:704-708.
- Taussig R y Gilman AG (1995) *J Biol Chem* **270**:1-4.

- Tauton O, Roth J y Pastan I (1967) *Biochem Biophys Res Commun* **29**:1-7.
- Taylor SS (1989) *J Biol Chem* **264**:8443-8446.
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4350-4357.
- Tran K, Wong JT, Lee E, Chan AC y Choy PC (1996) *Biochem J* **319**(Pt 2):385-391.
- Tran K, Lee E, Wong J, Man RY, Jay FT, Chan AC y Choy PC (1997) *Adv Exp Med Biol* **407**:123-9.
- Tuckey RC y Atkinson HC (1989) *Eur J Biochem* **186**:255-259.
- Tuckey RC (1992) *J Steroid Biochem Mol Biol* **42**:883-890.
- Tuls J, Geren L, Lambeth JD y Millet F (1987) *J Biol Chem* **262**:10020-10025.
- van Bilsen M, van der Vusse GJ y Reneman RS (1998) *Pflugers Arch* **437**(1):2-14.
- van Voorhis BJ, Dunn MS, Falck JR, Bhatt RK, van Rollins M y Snyder GD (1993) *J Clin Endocrinol Metab* **76**:1555-1559.
- Vandromme M, Gauthier-Rouviere C, Lamb N y Fernández A (1996) *Trends Biochem Sci* **21**:59-64.
- Veldhuis J y Klase PA (1982) *Endocrinology* **111**:1-8.
- Vilgrain I, Chinn A, Gaillard I, Chambaz EM y Feige JJ (1998) *Biochem J* **1**:533-540.
- Wallukat G, Morwinski R y Kuhn H (1994) *J Biol Chem* **269**: 29055-29060 .
- Wang XJ y Stocco DM (1999) *Mol Cell Endocrinol* **158**:7-12.
- Wang XJ, Walsh LP y Stocco DM (1999-a) *Endocrine* **10**:7-12.
- Wang XJ, Reinhart AJ, Walsh LP y Stocco DM (1999-b) *FASEB J* **13**:556.
- Wang XJ, Walsh LP, Reinhart AJ y Stocco DM (2000) *J Biol Chem* **275**:20204-20209.
- Whitehouse BJ, Gyles SL, Burns CJ, Cock MH y Jones PM (2000) *Endocrine Research* **26**(4):617-621.
- Williams G y Braley L (1977) *J Clin Endocrinol Metab* **45**:55-64.
- Woods MJ y Williams DC (1996) *Biochem Pharmacol* **52**:1805-1814.
- Yago N e Ichii S (1969) *J Biochem* **65**:215-224.
- Yamada J, Matsumoto I, Furihata T, Sakuma M y Suga T (1994) *Arch Biochem Biophys* **308**:118-125.
- Yamada J, Suga K, Furihata T, Kitahara M, Watanabe T, Hosokawa, Satoh T y Suga T

(1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**:608-612.

- Yamada J, Kurata A, Hirata M, Taniguchi T, Takama H, Furihata T, Shiratori K, Iida N, Takagi-Sakuma M, Watanabe T, Kurosaki K, Endo T y Suga T (1999) *J Biochem (Tokyo)* **126(6)**:1013-1019.