

Tesis Doctoral

Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides y participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata

Martini, Claudia Noemí

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires 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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Martini, Claudia Noemí. (2004). Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides y participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3805_Martini

Cita tipo Chicago:

Martini, Claudia Noemí. "Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides y participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3805_Martini

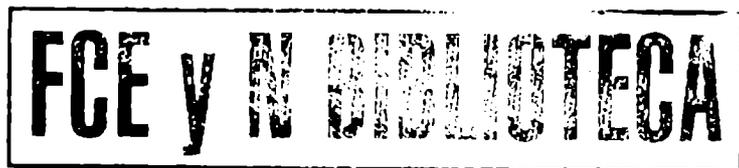
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**EFFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE HEMO SOBRE LA SÍNTESIS
DE ESTEROIDES Y PARTICIPACIÓN DE
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL EN LA RESPUESTA DE ACTH
EN CORTEZA ADRENAL DE RATA.**

Autor:

Claudia Noemí Martini

Directora de Tesis:

Dra. María del Carmen Vila

38054

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
-2004-

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
FACULTY OF SCIENCE

**EFFECT OF HEME AVAILABILITY ON STEROID SYNTHESIS AND
INVOLVEMENT OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL IN
ACTH RESPONSE IN RAT ADRENAL CORTEX.**

Author:

Claudia Noemí Martini

Thesis Director:

Dra. María del Carmen Vila

Thesis in candidature for the degree of
Doctor of the University of Buenos Aires
-2004-

A Mario, Matías y Santiago.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A mi hermana Clarisa.

Agradecimientos:

A la Dra. María del Carmen Vila, como directora, por haberme permitido trabajar a su lado, guiado y estimulado continuamente.

Al Dr. Eduardo Cozza por haberme iniciado en la investigación.

A la Dra San Martín de Viale por sus consejos y apoyo.

Al Dr. Celso Gomez Sanchez por facilitarme los anticuerpos antialdosterona y anticorticosterona.

A Damián Romero por estar siempre dispuesto a ayudarme y por enseñarme muchos secretos del laboratorio.

A Silvia Vaena por compartir el laboratorio y la rutina diaria.

A Silvia Billi, Adriana, Cristina, Marta, Sandra, Noemí y Carmen por su afecto y predisposición a solucionarme los problemas.

A los integrantes del Departamento de Química Biológica por todos estos años compartidos.

Al Departamento de Química Biológica del la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme brindado el espacio y apoyo económico para llevar adelante mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las Becas que me permitieron la realización de esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad de Morón por el apoyo brindado a los proyectos de investigación de los cuales forma parte mi trabajo.

Resumen

Dado que en la síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol participan distintos citocromos P450, que son hemoproteínas, es posible que exista una relación entre la síntesis de esteroideas y la de hemo. Con el fin de analizar esta posibilidad, en el presente trabajo se estudió el efecto del agregado de hemina sobre la síntesis de esteroideas en adrenales de rata. Se encontró que la adición de hemina *in vitro* a homogenatos de adrenal o la administración de hemina a ratas *in vivo*, estimulan la síntesis de esteroideas. Por otro lado, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina, fue capaz de inhibir la síntesis de hemo en adrenal similarmente a lo que ha sido descrito en hígado, por inhibición de la última enzima de esta biosíntesis, la ferroquelatasa. El bloqueo de la síntesis de hemo en adrenal con DDC produjo una disminución de la acumulación de aldosterona y corticosterona producida por ACTH. Este efecto del DDC fue parcialmente revertido por tratamiento de las ratas con hemina. Es decir que el contenido de hemo es un factor limitante de la respuesta de un estimulador de la síntesis de esteroideas como ACTH. El fenobarbital, un conocido inductor de la síntesis de hemo, que estimula la transcripción de la enzima reguladora de esta biosíntesis, el ALA-sintasa, actuando sobre el promotor de este gen que es el mismo que se expresa en adrenal, fue capaz de estimular la síntesis de aldosterona y corticosterona en adrenales de rata. Además, se encontró que estimuladores de la síntesis de esteroideas en adrenal, como ACTH y endotelina, son capaces de aumentar el mRNA de ALA-sintasa de modo de asegurar una suficiente provisión de hemo para transformar los apocitocromos libres, involucrados en síntesis de esteroideas, en holocitocromos activos. Es decir que la disponibilidad de hemo afecta la síntesis de esteroideas y los estimuladores de la síntesis de esteroideas aumentan el mRNA de ALA-s para asegurar esta disponibilidad.

También en este trabajo se investigó la participación de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la respuesta de ACTH. Teniendo en cuenta que se había informado que ACTH estimula una fosfolipasa C que hidroliza GPI, lo que libera inositolfosfoglicano (IPG), que es capaz de inhibir la acumulación de esteroideas mediada por ACTH y que ACTH estimula la liberación al medio extracelular de fosfatasa alcalina, una enzima anclada a la superficie celular por GPI; se quiso investigar si la liberación de fosfatasa alcalina por ACTH está mediada por una fosfolipasa C que hidroliza GPI y el mecanismo involucrado en la activación de esta fosfolipasa. Se encontró que ACTH a través de AMPc activa una Gi que es necesaria para la activación de una fosfolipasa C de GPI involucrada en la liberación de fosfatasa alcalina por la hormona. Es decir que el receptor de ACTH, como ha sido descrito con otros receptores acoplados a Gs que estimulan la producción de AMPc, es capaz de producir un posterior acoplamiento a Gi mediado por AMPc. Este acoplamiento a Gi media la activación de una fosfolipasa C de GPI lo que produce IPG que, como se había visto, es capaz de inhibir la respuesta de la hormona. Por lo tanto, la respuesta de

ACTH se inicia con un acoplamiento a Gs y posteriormente se produce un acoplamiento a Gi que mediaría una señal de apagado de la respuesta.

Palabras claves: síntesis de esteroides, aldosterona, corticosterona, citocromo P450, síntesis de hemo, ALA-sintasa, ACTH, glicosilfosfatidilinositol, fosfatasa alcalina, Gi, fosfolipasa C, corteza adrenal.

Abstract

Since different cytochromes P450, which are heme proteins, are involved in steroid biosynthesis; an interdependence between heme and steroid biosynthesis might occur. In order to evaluate this possibility, the effect of the addition of hemin on steroid biosynthesis in rat adrenals was investigated. It was found that *in vitro* addition of hemin to adrenal homogenates as well as hemin administration to rats *in vivo* increase steroid production. On the other hand, DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine, was able to inhibit heme biosynthesis in adrenal in a way similar to that reported for liver, by inhibiting the last step in heme biosynthesis, ferrochelatase activity. The blockage of heme biosynthesis in adrenal with DDC provoked a decrease in ACTH-mediated aldosterone and corticosterone accumulation. The effect of DDC was partially reversed by ACTH treatment. Thus adrenal heme content is limiting the response of an stimulator of steroid synthesis such as ACTH. Phenobarbital, a known activator of heme synthesis, which stimulates the transcription of the regulatory enzyme of this pathway, ALA-synthase, upon activation of the promotor of this gene that is also expressed in adrenal, was able to increase aldosterone and corticosterone synthesis in rat adrenal. In addition, it was found that stimulators of steroid biosynthesis, such as ACTH and endothelin, were able to increase, the mRNA of ALA-synthase, in order to provide enough heme to transform steroidogenic apocytochromes into active holocytochromes. In conclusion, heme availability affects steroid biosynthesis and stimulators of steroid biosynthesis increase ALA-synthase mRNA to ensure this availability.

It was also investigated the involvement of glycosylphosphatidylinositol (GPI) in ACTH action. Taking into account that it was reported that ACTH activates a GPI-phospholipase C releasing inositolphosphoglycan (IPG) which inhibits ACTH-mediated steroid accumulation and that ACTH increases the release to the extracellular medium of a GPI-anchored protein, alkaline phosphatase; the involvement of GPI-phospholipase C on the release of this enzyme by the hormone and its mechanism of activation was evaluated. It was found that ACTH through cAMP activates G_i , which mediates the activation of a GPI-phospholipase C that releases alkaline phosphatase. Thus ACTH receptor, as it was reported for other G_s -coupled receptors which increase cAMP production, is able to couple to G_i and the switch is mediated by cAMP. Once coupled to G_i , ACTH receptor activates a GPI-phospholipase C which in turn produce IPG that is able to inhibit ACTH action. ACTH action is initiated by coupling to G_s , then cAMP-mediated switch to G_i occurs, which signals to turn off the response.

Key words: steroid synthesis, aldosterone, corticosterone, cytochrome P450, heme synthesis, ALA-synthase, ACTH, glycosylphosphatidylinositol, alkaline phosphatase, G_i , phospholipase C, adrenal cortex.

INDICE

Capítulo 1. Introducción

	página
1.1 Las glándulas adrenales.....	2
1.2 Biosíntesis de hormonas esteroideas.....	2
1.2.1 Citocromo P 450 SCC.....	5
1.2.2 Citocromo P450 21-hidroxilasa (CYP 21).....	10
1.2.3 Citocromos P450 11 β 1 (CYP11B1) y β 2 (CYP11B2).....	13
1.3 Reguladores de la biosíntesis de mineralocorticoides.....	14
1.3.1 Endotelinas.....	15
1.4 Reguladores de la biosíntesis de glucocorticoides.....	17
1.5 Camino metabólico del hemo.....	20
1.5.1 ALA-s.....	22
1.5.2 Ferroquelatasa.....	23
1.6 Porfirias.....	24
1.7 Drogas porfirinogénicas.....	24
1.8 Glicosilfosfatidilinositoles.....	25
1.8.1 Heterogeneidad en las estructuras de GPI.....	27
1.8.2 Biosíntesis de GPI.....	28
1.8.3 Proteínas con ancla de GPI identificadas.....	32
1.8.4 Liberación por fosfolipasas de las proteínas con ancla de GPI.....	33
1.8.5 Distintas funciones de GPI.....	35
1.8.5.1 Participación de GPI en procesos infecciosos.....	35
1.8.5.2 Participación de GPI en señales intracelulares.....	37
1.8.5.3 Participación de GPI en la respuesta de insulina....	38
1.8.5.4 Participación de GPI en la respuesta de ACTH.....	39
Objetivos del presente trabajo.....	40

Capítulo 2. Métodos

2.1 Estudios "in vivo" con ratas.....	43
2.1.1 Tratamiento de las ratas por inyección.....	43
2.1.1.1 Tratamiento de las ratas con DDC.....	43
2.1.1.2 Tratamiento de las ratas con fenobarbital.....	43
2.1.1.3 Tratamiento de las ratas con ACTH para Northern-blot. .	44
2.1.2 Tratamiento de las ratas por infusión.....	44
2.1.2.1 Infusión de ACTH y/o hemina.....	45
2.1.2.2 Infusión de ACTH o endotelina.....	45
2.2 Estudios en células adrenocorticales de rata. Preparación de células.	45
2.3 Determinación de la producción de aldosterona y corticosterona en suspensiones de células adrenocorticales.....	46
2.4 Determinación de la producción de aldosterona y corticosterona en homogenatos de adrenal en presencia de hemina.....	47
2.5. Determinación de la actividad de ALA-s.....	47
2.6 Determinación de la actividad de ferroquelatasa.....	50
2.7 Determinación del contenido de porfirinas.....	52
2.8 Determinación de proteínas.....	52
2.9 Cuantificación de los esteroides por radioinmunoensayo.....	52
2.9.1 RIA de aldosterona.....	54
2.9.2 RIA de corticosterona.....	54
2.9.3 Preparación de las muestras para las cuantificaciones por RIA.	54
2.9.3.1 Determinación de concentraciones de esteroides en adrenal.....	54
2.9.3.2 Determinación de la concentración de esteroides en las incubaciones con células dispersas.....	55
2.9.3.3 Determinación de los niveles séricos de corticosterona..	55
2.10 Cuantificación de mRNA.....	55
2.10.1 Aislamiento de RNA.....	55
2.10.2 Cuantificación del mRNA de ALA-s por Northern-blot.....	56

2.10.3 Cuantificación del mRNA de ALA-s por ensayo de protección a ribonucleasa (RPA).....	57
2.10.4 Cuantificación del mRNA de Cyp21 por ensayo de protección a ribonucleasa (RPA).....	58
2.11 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.....	58
2.12 Separación de FAL libre y anclada con Tritón X-114.....	59
2.13 Detección de Gi por Western-blot en células adrenocorticales.....	59
2.14 Efecto de anticuerpos anti-Gi sobre la liberación de fosfatasa alcalina.	62

Capítulo 3. Resultados

3.1 EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE HEMO SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES EN CORTEZA ADRENAL.....	64
3.1.1 Efecto del tratamiento con hemina sobre la síntesis de esteroides.....	64
3.1.2 Efecto del DDC sobre la síntesis de hemo en adrenal.....	64
3.1.3 Efecto del DDC sobre la síntesis de esteroides en adrenal.....	67
3.1.4 Efecto de fenobarbital sobre la producción de esteroides.....	70
3.1.5 Efecto de inductores de la síntesis de esteroides sobre los niveles de mRNA DE ALA-S y CYP-21.....	73
3.1.5.1 Efecto de ACTH sobre el mRNA de Ala-s cuantificado por Northern-blot.....	73
3.1.5.2 Efecto de ACTH sobre el mRNA de CYP-21 cuantificado por Northern-blot.....	76
3.1.5.3 Efecto de ACTH sobre el mRNA de ALA-s y CYP21 cuantificados por RPA.....	78
3.1.5.4 Efecto de ACTH sobre la actividad de ALA-s en adrenal de rata.....	82
3.1.5.5 Efecto de endotelina sobre el mRNA de ALA-s y CYP21 cuantificado por RPA.....	83

3.2 PARTICIPACIÓN DE GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL EN LA RESPUESTA DE ACTH EN CORTEZA ADRENAL DE RATA.....	86
3.2.1 Evaluación de la participación de una fosfolipasa C en la liberación de FAL por ACTH.....	87
3.2.1.1 Estudios con tritón X-114.....	87
3.2.1.2 Estudios con inhibidores de fosfolipasa C.....	89
3.2.1.3 Estudios con inhibidores de la entrada de IPG en la célula.....	94
3.2.2 Participación de AMPc en la liberación de FAL por ACTH.....	96
3.2.3 Participación de una proteína G en la liberación de FAL por ACTH.....	97
3.2.4 Efecto de anticuerpos anti-inositolfosfoglicano y toxina de pertussis sobre la acumulación de esteroides producida por ACTH.....	102

Capítulo 4. Discusión

4.1 Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides en corteza adrenal.....	106
4.2 Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata.....	110

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides en corteza adrenal.....	114
5.2 Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata.....	115

Bibliografía.....	117
--------------------------	------------

Lista de Figuras

Figura 1: Zonas de la glándula adrenal.....	3
Figura 2: Biosíntesis de corticosterona y aldosterona a partir de colesterol.....	5
Figura 3: Biosíntesis de aldosterona, cortisol y androstenediona a partir de colesterol.....	11
Figura 4: Camino metabólico del hemo.....	21
Figura 5. Estructura esquemática de una proteína con ancla de GPI.....	26
Figura 6. Efecto de hemina sobre la producción de aldosterona y corticosterona.....	65
Figura 7. Efecto de hemina sobre la producción de aldosterona. Reversión parcial del bloqueo producido por DDC.....	69
Figura 8. Efecto de FB sobre el contenido de aldosterona y corticosterona en adrenal de rata.....	72
Figura 9. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de ALA-s en adrenal de rata.....	75
Figura 10. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de CYP-21 en adrenal de rata.....	77
Figura 11. Cuantificación del mRNA de ALA-s en adrenal por RPA.....	78
Figura 12. Aumento del mRNA de ALA-s producido por un conocido inductor de esta enzima en hígado.....	79
Figura 13. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de ALA-s y CYP-21 en adrenal de rata.....	81
Figura 14. Efecto del tratamiento con endotelina sobre el mRNA de ALA-s y CYP-21 en adrenal de rata.....	85
Figura 15. Efecto del pCMPSA sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH.....	90
Figura 16. Efecto del U73122 sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH.....	93

Figura 17. Detección de Gi por western-blot.....	101
Figura 18. Efecto de la toxina de pertussis y anti-CRD sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH.....	103

Lista de Tablas

Tabla 1. Efecto de DDC sobre las actividades de ferroquelatasa y ALA-s y sobre el contenido de porfirinas en glándula adrenal y en hígado.....	66
Tabla 2. Efecto de FB sobre la actividad de ALA-s en hígado de rata.....	71
Tabla 3. Efecto del tratamiento crónico de ACTH sobre el contenido de corticosterona en homogenato de adrenal de rata.....	75
Tabla 4. Efecto de ACTH sobre corticosterona en suero.....	80
Tabla 5. Efecto de ACTH sobre la actividad de ALA-s en adrenal de rata.....	83
Tabla 6. Efecto de endotelina sobre aldosterona en adrenal.....	84
Tabla 7. Partición en tritón X 114 de la fosfatasa alcalina liberada al medio extracelular.....	88
Tabla 8. Efecto del pretratamiento con U73122 sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH o AMPc en células adrenocorticales de rata.....	92
Tabla 9. Efecto del inositol 2-monofosfato y NaCl 2M sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	95
Tabla 10. Efecto del pretratamiento con toxina de pertussis sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH o AMPc en células adrenocorticales de rata.....	98
Tabla 11. Efecto de anticuerpos anti-Gi sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata.....	100

Fe de erratas:

- Figura 1 (INTRODUCCION pag. 3): Esta figura fue copiada del libro "Vertebrate Endocrinology" de David O. Norris, 3d. edition, 1996, Academic Press, San Diego, CA, USA. Corresponde a la Fig.-9-2, en el capítulo 9, pag. 303.

- Trabajos citados en la INTRODUCCION (pag. 17) que no aparecen en la bibliografía:

Mazzocchi G., Rebuffat P., Meneghelli V., Malendowicz L. K., Kasprzak A., Nussdorfer G. G. (1990). Effects of prolonged infusion with endothelin-1 on the function and morphology of rat adrenal cortex. *Peptides*. 11: 767-772

Mazzocchi G., Malendowicz L. K. Meneghelli V., Nussdorfer G. G. (1992) Endothelin-1 stimulates mitotic activity in the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex. *Cytobios*. 69:91-96.

Mazzocchi G, Rossi GP, Rebuffat P, Malendowicz LK, Markowska A, Nussdorfer GG. (1997). Endothelins stimulate deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C- and tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Endocrinology*. 138:2333-2337

- Figura 7 (RESULTADOS pag. 69): En la leyenda respecto a significancia de los resultados debe decir:

+ $p < 0,05$ con respecto a ACTH, ++ $p < 0,05$ con respecto a ACTH+DDC (prueba t de Student)

Los experimentos y resultados de esta Tesis Doctoral fueron publicados parcialmente y forman parte de los siguientes trabajos:

Heme availability affects corticosterone and aldosterone biosynthesis in rat adrenal.

Claudia N. Martini, Silvia G. Vaena de Avalos, Damián G. Romero, Leonor San Martín de Viale, María del C. Vila.

Steroids. 62: 767-770. (1997)

ACTH stimulates the release of alkaline phosphatase through Gi-mediated activation of a phospholipase C and the release of inositolphosphoglycan.

Claudia N. Martini, Silvia G. Vaena de Avalos, María del C. Vila.

Molecular and Cellular Biochemistry. 258: 191-199 (2004)

Rapid induction of 5-aminolevulinatase by ACTH and endothelin in rat adrenal.

Claudia N. Martini, Damián Romero, María del Carmen Vila.

Manuscrito en preparación.

INTRODUCCION

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1. Las glándulas adrenales.

Las glándulas adrenales son estructuras pares que se localizan sobre el polo superior de cada riñón y poseen una configuración en forma aproximadamente piramidal, están rodeadas por una cápsula de tejido conectivo y embebidas en tejido adiposo.

Al seccionar en mitades las glándulas adrenales, se pueden observar a *simple vista*, dos regiones, la interna más clara o médula y la externa o corteza. La región medular es de origen nervioso, deriva de células neuroectodérmicas de los ganglios simpáticos y segrega catecolaminas. La corteza adrenal es de origen mesodérmico, y posee tres zonas que, desde afuera hacia adentro, se denominan glomerulosa, fasciculata y reticularis (Figura 1). La zona glomerulosa produce mineralocorticoides, la zona fasciculata produce glucocorticoides y la zona reticularis sintetiza esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos, los cuales contribuyen a establecer y mantener los caracteres sexuales secundarios.

1.2. Biosíntesis de hormonas esteroideas.

La corteza de la glándula adrenal sintetiza y secreta esteroides que se conocen con el nombre genérico de corticoides. Estas hormonas pueden ser glucocorticoides o mineralocorticoides. Los glucocorticoides regulan el metabolismo de los hidratos de carbono y la respuesta al stress y los mineralocorticoides mantienen el balance salino.

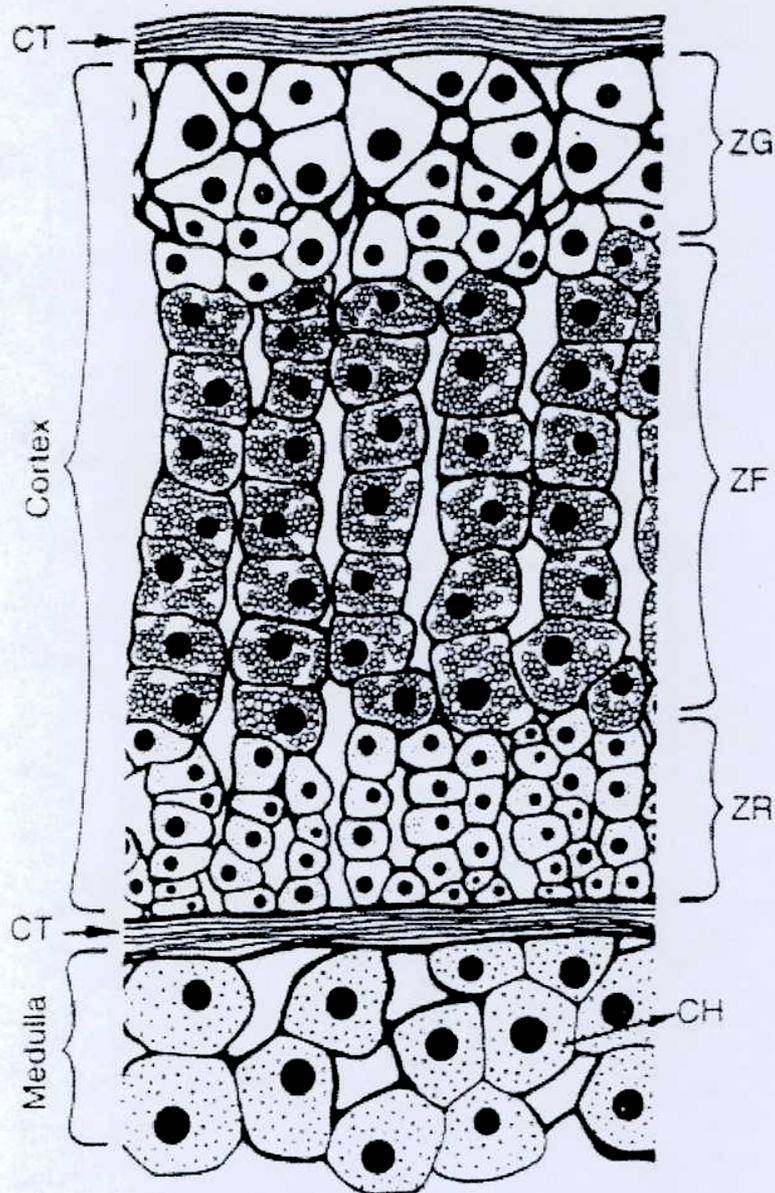


Figura 1: Zonas de la glándula adrenal. La corteza consiste en una capa externa de tejido conectivo (CT), la zona glomerulosa (ZG) que produce aldosterona, la zona fasciculata (ZF) que produce glucocorticoides y la zona reticularis (ZR) que produce esteroides sexuales. La médula adrenal está separada de la corteza por otra capa de tejido conectivo (CT) y consiste principalmente en células cromafines (CH) que secretan catecolaminas y opioides endógenos.

Aldosterona es el principal mineralocorticoide en todos los mamíferos estudiados. Esta uniformidad no ocurre con los glucocorticoides. En efecto, mientras el cortisol es el principal mineralocorticoide en la vaca, el cerdo y el ser humano; la corticosterona lo es en la rata y el ratón, pues estos últimos no pueden sintetizar cortisol.

Los esteroides se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol. Esta biosíntesis comprende principalmente reacciones de oxidación, tales como deshidrogenaciones o hidroxilaciones. Estas últimas son llevadas a cabo por enzimas de la familia de los citocromos P 450, que contienen al hemo como grupo prostético (Hall 1984).

Los citocromos P 450 involucrados en la biosíntesis de esteroides son:

- Citocromo P 450 SCC, encargado de la transformación de colesterol en pregnenolona.

- Citocromo P450 21 hidroxilasa (CYP21) que transforma la progesterona en 11-desoxicorticosterona (DOC).

- Citocromos P 450 11 β 1 (CYP11B1) y β 2 (CYP11B2). El primero que cataliza el paso tardío de DOC a corticosterona en la rata y el ratón, y también del derivado 17-hidroxilado, 11-desoxicortisol, a cortisol en el ser humano. CYP11B2 cataliza la conversión total de DOC a aldosterona tanto en la rata y el ratón como en el ser humano (Sander 1994, Kawamoto 1992).

- Citocromo P 450 11 β hidroxilasa/ 18-hidroxilasa/ aldo sintetasa, única enzima con capacidad para catalizar todas las reacciones involucradas en el metabolismo de DOC a aldosterona y de 11-desoxicortisol a cortisol en vaca y cerdo (Yanagibashi 1986, Wada 1984).

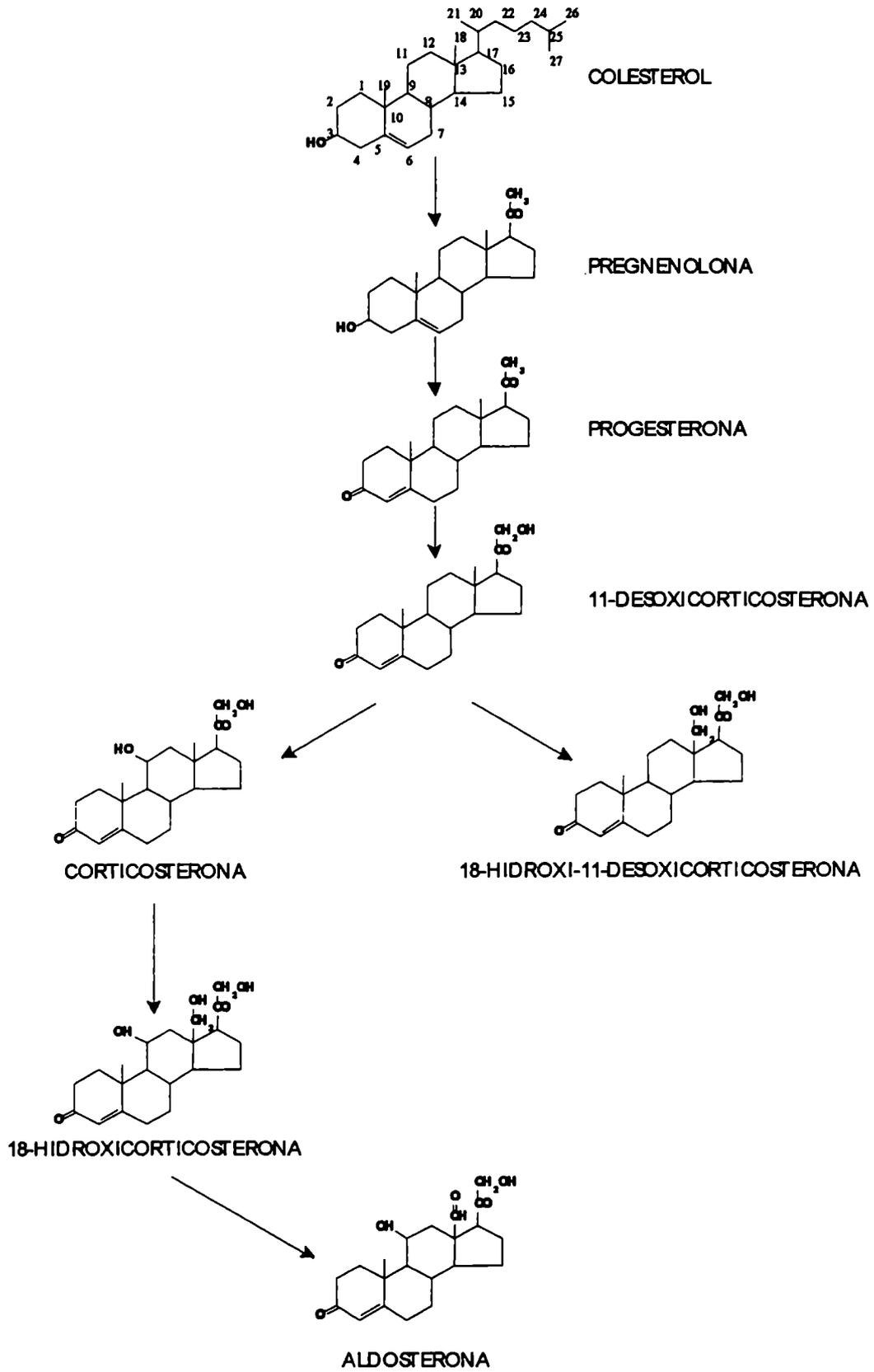
1.2.1 Citocromo P 450 SCC

La biosíntesis de todas las hormonas esteroideas en respuesta a hormonas tróficas y otros estímulos esteroiogénicos comienza con la ruptura de la molécula de colesterol de 27 átomos de carbono para formar el primer esteroide sintetizado, la pregnenolona, de 21 átomos de carbono (Figura 2). La numeración de los átomos de carbono de los esteroides aparece en la figura 2.

La reacción de formación de pregnenolona es catalizada por el citocromo P 450 SCC (del inglés: cytochrome P 450 side chain cleavage), el cual rompe la cadena lateral del colesterol y está localizado en la membrana mitocondrial interna hacia la matriz (Simpson, 1966; Simpson, 1967; Yago, 1969; Churchill, 1979).

El citocromo P 450 SCC está codificado por el gen CYP11A1 cuya expresión esta regulada para una correcta secreción de esteroides (Chung, 1997; Miller, 1988). Cyp11A1 se expresa principalmente en la adrenal y las gónadas, como así también en la placenta durante el embarazo (Guo, 1993). Además de expresarse en estas glándulas endócrinas, se expresa en el cerebro produciendo neuroesteroides (Le Goascogne, 1987; Compagnone, 1995; Kohchi 1998). Tanto las adrenales como las gónadas parecen tener mecanismos similares de regulación de la expresión de CYP11A1 (Mellon, 1997), en cambio, la placenta y el cerebro, parecen tener mecanismos diferentes (Guo, 1993; Zhang, 1995).

Figura 2: Biosíntesis de corticosterona y aldosterona a partir de colesterol. En la figura se indica la numeración de los átomos de carbono de la molécula de colesterol y las reacciones que median su transformación en corticosterona y aldosterona.



La expresión de CYP11A1 en adrenales y gónadas es estimulada por hormonas hipofisarias (Miller, 1988). La hormona adrenocorticotrófica (ACTH) secretada por la hipófisis estimula la expresión de Cyp11A1 en adrenal. Similarmente gonadotrofinas secretadas por la hipófisis estimulan la expresión de Cyp11A1 en las gónadas. Estas hormonas hipofisarias se unen a receptores presentes en la membrana de las células de adrenal o gónadas, que están acoplados a la proteína ligante de GTP estimuladora (Gs) que produce aumento de los niveles intracelulares del segundo mensajero AMPc por activación de la enzima que cataliza su síntesis, la adenilato ciclasa. AMPc es el mensajero intracelular que transmite la señal para incrementar la transcripción de CYP11A1 (Hu, 1991; Kramer, 1984). Además de esta regulación hormonal, la expresión de CYP11A1 está regulada durante el desarrollo (Ikeda, 1994).

Aunque la transcripción de CYP11A1 esta incrementada por mecanismos dependientes de AMPc, el promotor de este gen carece del elemento consenso que responde a AMPc (CRE) lo que sugiere la participación de factores regulatorios alternativos en la respuesta de AMPc como por ejemplo SF1 (del inglés: steroidogenic factor 1).

Existen en el gen de CYP11A1 dos lugares de unión de SF1, P (próximo) y U (distante), localizados a -40 y -1600 pares de bases del lugar de comienzo de la transcripción respectivamente. Para analizar la función de cada uno de estos sitios se realizaron distintas mutaciones en el promotor de CYP11A1, se acopló al gen de Lac Z y se estudió su expresión en líneas de ratones transgénicos. La actividad del gen con el sitio P mutado fue muy reducida, indicando la importancia de este sitio. La mutación del sitio que está río arriba, el U, también produjo una reducción de la expresión pero quedó alguna actividad residual que fue detectada en las adrenales y gónadas, es decir, con expresión tejido específica. Se vio que ACTH y gonadotrofina coriónica humana (HCG) podían estimular la expresión de Lac Z en adrenales y testículos en los ratones transgénicos con el promotor salvaje pero no el que tiene mutado el sitio U. Es decir, que el sitio U de SF1 es necesario para la estimulación hormonal (Hu, 2001).

Por muchos años, se consideró que la actividad del citocromo P 450 SCC era el paso limitante en la esteroidogénesis. Sin embargo, estudios más recientes indican que el verdadero paso limitante es el pasaje del colesterol desde las reservas intracelulares a su sitio de ruptura en la membrana interna de la mitocondria, donde se encuentra el citocromo P 450 SCC (Crivello, 1980; Privalle, 1983, Jefcoate, 1987). Este pasaje depende de la incorporación de lipoproteínas transportadoras de colesterol a la célula, de su transporte desde el lisosoma al citosol y la hidrólisis de los ésteres de colesterol. Este paso requiere de un citoesqueleto intacto pero no de síntesis de proteínas. Además se requiere la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna (Liscum, 1992; Jefcoat, 1992; Stocco, 1996). Todos los datos obtenidos indican que la principal barrera en la translocación del colesterol desde las reservas celulares al citocromo P 450 SCC es el espacio acuoso presente entre la membrana mitocondrial externa e interna. Es por lo tanto, este pasaje del colesterol a través del espacio acuoso entre las membranas el que se considera el paso limitante en la esteroidogénesis.

Uno de los primeros datos obtenidos sobre esteroidogénesis y que resultó de gran importancia, fue que la producción aguda de esteroides en respuesta a un estímulo hormonal tenía un requerimiento absoluto de síntesis *de novo* de proteínas (Ferguson, 1962; Ferguson, 1963; Garren, 1965; Garren, 1966).

Numerosos estudios posteriores (Cooke, 1975; Paul, 1976; Farese, 1979; Crivello, 1978; Toaff, 1979; Solano, 1984; Stevens, 1993) indicaron que la producción aguda de esteroides era dependiente de una proteína altamente lábil, sensible a cicloheximida, rápidamente sintetizada y dependiente de hormonas, cuya función era mediar la transferencia del colesterol desde la membrana externa de la mitocondria a la membrana interna y al P450 SCC. Hasta la fecha, la mejor candidata para la regulación aguda de la esteroidogénesis es una proteína mitocondrial de 30 KDa llamada StAR (del inglés: Steroidogenic Acute Regulatory protein, proteína regulatoria de la esteroidogénesis aguda) (Clark, 1994), que es esencial para la producción regulada de hormonas esteroideas y que media la translocación del colesterol a la membrana interna mitocondrial donde comienza la esteroidogénesis.

El clonado y la secuenciación del cDNA de StAR indicaron que era una proteína nueva y las transfecciones transientes con el cDNA de StAR resultaron en una estimulación de la esteroidogénesis en ausencia de estímulo. Además se encontró que mutaciones en el gen de StAR causan la enfermedad potencialmente letal, hiperplasia adrenal lipoidea congénita, en la cual está bloqueada la transferencia de colesterol al citocromo P 450 SCC, cargándose la célula con colesterol y ésteres de colesterol. Los ratones que son "knock out" para el gen de StAR tienen un fenotipo similar a la enfermedad humana. El efecto de estas deleciones sugieren que StAR es necesaria para el 80-90% del metabolismo del colesterol en adrenal. StAR se expresa selectivamente en todos los tejidos esteroidogénicos menos la placenta (Clark, 1995) que podría expresar otro miembro de la familia de StAR (Watari, 1997).

La actividad de transferencia de colesterol de StAR reside en la porción C-terminal de la molécula y se mostró que una proteína que tiene alta homología con una región en el extremo C-terminal de StAR, muestra capacidad de transferencia de colesterol. Evidencias recientes indican que StAR puede actuar como una proteína transportadora de esteroides y es probablemente esta característica la que le permite movilizar colesterol a la membrana mitocondrial interna (Stocco, 2000).

La transcripción basal de StAR requiere de PKA, de SF1 y C/EBP β (Sandhoff, 1998; Sugawara, 1996; Caron, 1997; Sugawara, 1997; Reinhard, 1999). La expresión de StAR es regulada en forma aguda en respuesta a hormonas por un proceso dependiente de APMc que no requiere síntesis de factores de transcripción (Stocco, 1996). También se ha visto que las lipoproteínas transportadoras de colesterol (HDL y LDL) regulan la expresión de StAR, esta regulación estaría mediada por colesterol y podría representar un feedback positivo para asegurar una máxima utilización en la formación de hormonas esteroideas (Reyland, 2000).

También se demostró que la fosforilación de StAR regula su actividad esteroidogénica (Arakane, 1997).

StAR es sintetizada como una proteína precursora de 37kDa (p37) fosforilada por PKA y clivada en la mitocondria para dar una proteína o

fosfoproteína de 30kDa (p30, pp30). Se ha visto que una StAR recombinante que no es importada por la mitocondria es activa lo que hizo pensar que StAR actuaba desde la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, en un trabajo más reciente (Artemenko, 2001) se mostró que sólo la StAR recientemente sintetizada es activa, que la fosforilación y el procesamiento de p37 a pp30 ocurre rápida y estequiométricamente, que ambos pasos son necesarios para un transporte óptimo del colesterol y que la enzima recién sintetizada posee una muy alta actividad.

1.2.2 Citocromo P450 21-hidroxilasa (CYP 21)

La 3 β 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa delta4-isomerasa (3 β -HSD) convierte pregnenolona a progesterona (Figura 2 y 3) en el retículo endoplásmico y la mitocondria (Cherradi, 1997).

El citocromo P450 21-hidroxilasa (CYP21) convierte progesterona y 17-hidroxi-progesterona a 11-deoxicorticosterona y 11-desoxycortisol respectivamente (Figura 2 y 3), que son sustratos obligatorios para la producción de aldosterona, cortisol y corticosterona.

CYP21 (también llamada 21-monooxigenasa, P450 c21) es otro miembro de la superfamilia de los citocromos P450, que funciona como oxidasa terminal y requiere como coenzima a una reductasa NADPH-dependiente. Se localiza en el retículo endoplásmico.

Tanto deleciones como mutaciones del gen de CYP21 es el defecto genético más frecuente que afecta al sistema esteroidogénico. La deficiencia enzimática de CYP21 está asociada a la hiperplasia adrenal congénita una enfermedad genética que afecta la esteroidogénesis adrenal humana con una incidencia de 1 en 15.000 (Morel, 1991; Pang, 1988).

Se han identificado en el humano dos genes para CYP21, CYP21A y CYP21B. El gen CYP21B codifica para la forma activa de la proteína y CYP21A, también llamado CYP21P, es un pseudogen que codifica para una proteína inactiva, ya que contiene varias mutaciones puntuales y una deleción de 8 pares de bases en el exón 3 (Higashi, 1986).

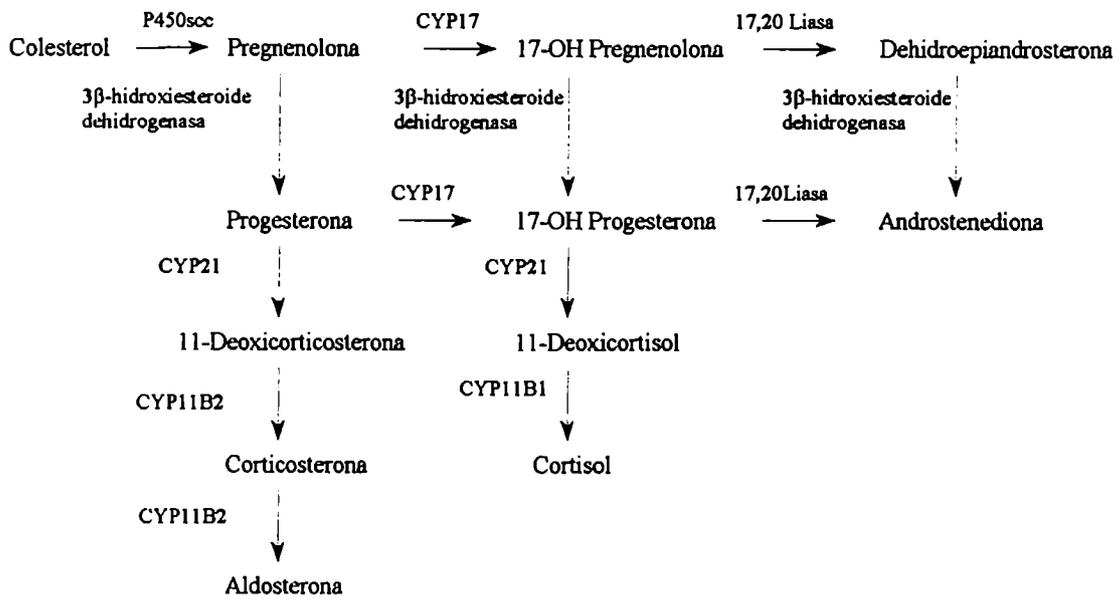


Figura 3: Biosíntesis de aldosterona, cortisol y androstenediona a partir de colesterol. En la figura se indican las reacciones que median la transformación del colesterol en aldosterona, cortisol y androstenediona.

El gen que codifica CYP21 está localizado en el cromosoma 6p21.1, dentro del locus de la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad (White, 1985). El gen CYP21 contiene 10 exones con una extensión de 3.4kb (Higashi 1986; Rodrigues, 1987). Los dos genes CYP21, el activo y el pseudogen CYP21P, se encuentran en tandem junto al gen del complemento del suero C4 (C4A y C4B), es decir: 5'-C4A-CYP21P-C4B-CYP21-3', con la misma dirección de transcripción (Higashi, 1986; White, 1986; Nebert, 1991).

CYP21 y CYP21P se expresan específicamente en la adrenal y como son un par de genes duplicados hay una homología mayor al 98% entre ellos que incluye la región flanqueante en 5', las secuencias de intrones y exones (Higashi, 1986; Rodrigues, 1987; White, 1986). Esta alta homología en las secuencias de DNA causa frecuentes recombinaciones genéticas. Por lo tanto las mutaciones características de los pacientes con hiperplasia adrenal

congénita son: mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o conversiones del gen activo al pseudogen, que resultan en actividad enzimática deficiente (Higashi, 1986; Rodrigues, 1987; White, 1986; Miller, 1989; Speiser, 1992; Speiser, 1988).

El grado por el cual cada mutación compromete la actividad enzimática se correlaciona fuertemente con la severidad clínica de la enfermedad. El defecto fundamental en los pacientes con deficiencia de CYP21 es que no pueden sintetizar adecuadamente cortisol. La síntesis deficiente de cortisol provoca a nivel de hipotálamo y de hipófisis el incremento de CRH y ACTH, respectivamente, por lo que las adrenales se vuelven hiperplásicas, pero más que cortisol producen exceso de precursores de hormonas sexuales que no requieren de la hidroxilación en la posición 21 para su síntesis (Figura 3). Una vez secretadas estas hormonas continúan su transformación a andrógenos activos, testosterona y dihidrotestosterona, y en menor grado a estrógenos, estrona y estradiol (White, 2000).

Las hembras con deficiencia severa de CYP21 están expuestas prenatalmente a un exceso de andrógenos y nacen con genitales externos virilizados. La mayoría de los enfermos no pueden sintetizar suficiente aldosterona para mantener el balance salino y pueden potencialmente desarrollar crisis fatales de falta de sal si no son tratados. El diagnóstico prenatal por detección de mutaciones permite el tratamiento prenatal de las hembras afectadas para minimizar la virilización genital. El examen hormonal neonatal identifica los chicos afectados antes que desarrollen las crisis de falta de sal, reduciendo la mortalidad de esta condición. La terapia de reemplazo de glucocorticoides y mineralocorticoides es la principal forma de tratamiento (White, 2000).

El mRNA de la CYP21 en la adrenal es aumentado por ACTH (John, 1986).

1.2.3 Citocromos P450 11 β 1 (CYP11B1) y β 2 (CYP11B2)

En especies tales como humano, rata y ratón, CYP11B2, se encuentra sólo en la zona glomerulosa y cataliza la conversión completa de DOC a aldosterona, ya que tiene actividad 11 β -hidroxilasa, 18-hidroxilasa y 18-oxidasa (Figura 2 y 3).

En contraste, la principal forma de la enzima, CYP11B1, se encuentra casi exclusivamente en la zona fasciculata, no produce aldosterona y puede hidroxilar DOC, en rata y ratón (que carecen de actividad 17-hidroxilasa) o, su derivado 17 hidroxilado, 11 desoxicortisol, en humano. La hidroxilación ocurre sólo en una posición, en el C-11 β o en el C-18 (Müller, 1995). Sin embargo, tiene alta actividad 11 β -hidroxilasa, baja actividad 18-hidroxilasa y no tiene actividad de aldosterona sintetasa, por lo que sintetiza principalmente corticosterona y cortisol (Figuras 2 y 3).

El gen CYP11B2 se expresa en glomerulosa y tiene actividad de aldosterona sintetasa mientras que el gen CYP11B1 que es necesario para la síntesis de corticosterona y cortisol, se expresa en zona fasciculata.

La expresión de estas enzimas en una zona específica parece resultar de la regulación de la transcripción de los dos genes.

En rata y ratón se encontró que CYP11B1 y CYP11B2 están codificados por dos genes diferentes con mucha más alta homología de nucleótidos en su secuencia codificante (88%) que en su secuencia 5' río arriba (53%) (Nonaka, 1989; Imai, 1990 a; Matsukawa, 1990; Okamoto, 1992; Mukai, 1991; Nomura, 1993). Estas diferencias en la parte regulatoria de los genes explica las diferencias considerables en la expresión de los genes: 1) entre las zonas de la corteza adrenal; y 2) en respuesta a varios estímulos fisiológicos.

En otras especies, como vaca, oveja y cerdo, hay solamente un tipo de 11 β hidroxilasa, CYP11B. Cuando se extraen mitocondrias de adrenal independientemente de su zona de origen, glomerulosa o fasciculata, in vitro se produce la transformación de corticosterona a aldosterona. In situ, todas sus actividades catalíticas se ven en la zona glomerulosa. En cambio, dentro de la mitocondria de la zona fasciculata y de la zona reticularis, su actividad productora de aldosterona está completamente bloqueada por un mecanismo

desconocido, mientras que su actividad 11 β -hidroxilasa y 18-hidroxilasa permanecen intactas.

Se ha visto que el tratamiento de ratas con una dieta restringida en sodio por catorce días provoca un aumento de la transcripción del gen CYP11B2. Sin embargo, cuando este tratamiento se hace en presencia de inhibidores de la respuesta de angiotensina II no se encuentra ni aumento del mRNA de aldosterona ni de aldosterona en circulación (Kakiki, 1997).

Los niveles circulantes de angiotensina II y potasio son los principales reguladores de la producción adrenal de aldosterona mientras que la producción de cortisol o corticosterona es controlada principalmente por ACTH.

Mutaciones en CYP11B1 causan hiperplasia adrenal congénita (CAH) debido a la deficiencia de 11 β -hidroxilasa, caracterizada por exceso de andrógenos e hipertensión. Mutaciones en CYP11B2 causan hipoaldosteronismo congénito debido a la deficiencia de aldosterona sintetasa, la cual se caracteriza por pérdida de sal, que puede ser fatal e hiponatremia e hipercalemia en la primera infancia.

1.3 Reguladores de la biosíntesis de mineralocorticoides.

Dado que la aldosterona es el principal regulador de la homeostasia del sodio y del potasio, su biosíntesis tiene que estar continuamente adaptada a los cambios en el contenido corporal de sodio y potasio.

El exceso de aldosterona conduce a una pérdida de potasio e hipocalcemia, mientras que concentraciones de potasio extracelular elevadas estimulan directamente la producción de aldosterona.

La adaptación de la secreción de aldosterona al contenido de sodio es más compleja, involucra cambios en el volumen plasmático y en el sistema renina- angiotensina. Este sistema es el encargado de la transformación por medio de la renina de angiotensinógeno en angiotensina I, la cual es luego transformada en angiotensina II por acción de una enzima convertidora. De acuerdo con la mayoría de los investigadores, el estímulo final de la biosíntesis de aldosterona en respuesta a la deficiencia de sodio está dado por la angiotensina II.

Angiotensina II ocupa un receptor acoplado a proteína G que activa fosfolipasa C (Matsusaka, 1997). La última proteína hidroliza fosfatidilinositol difosfato para producir diacilglicerol e inositoltrifosfato, lo cual eleva los niveles intracelulares de calcio y se activan la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa dependiente de calmodulina (CaM). En forma similar, el otro regulador de los niveles de sodio plasmático, el potasio, incrementa el influjo de calcio a través de canales de calcio tipo-L (Barrett, 1989).

Sin embargo, alteraciones en el contenido corporal de sodio pueden influenciar la biosíntesis de aldosterona a través de otros mediadores, como por ejemplo, factores inhibitorios tales como el péptido natriurético atrial o una alta concentración de sodio extracelular. Por los mismos mecanismos, la secreción de aldosterona es completamente suprimida cuando el organismo está sobrecargado con sodio o restringido de potasio (Müller, 1995).

La secreción de aldosterona es casi, aunque no completamente, independiente de ACTH. La velocidad de síntesis de aldosterona es normalmente 100 a 1.000 veces menor que la de síntesis de cortisol. ACTH es un potente estimulador de la producción de aldosterona en células de la zona glomerulosa *in vitro* o en la glándula adrenal *in vivo*. Sin embargo, la respuesta esteroideogénica es mucho mayor en células de la zona fasciculata (Müller, 1988).

Por otro lado, existen numerosas evidencias que le otorgan un importante papel a la endotelina en la regulación de la secreción y crecimiento de la glándula adrenal.

1.3.1 Endotelinas.

Endotelina es un péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos con dos puentes disulfuro (Yanagisawa, 1988). Se identificaron 3 genes relacionados con endotelina en una genoteca humana: uno codificaba la endotelina "clásica", ET-1; otro la endotelina identificada en rata, ET-3, y el tercero una nueva endotelina que difería de ET-1 en dos aminoácidos, ET-2 (Inohue, 1989).

ET-1 es considerada la hormona más activa y común de esta familia, al menos a nivel sistémico. ET-2 dada su alta homología con ET-1 comparte

todas sus acciones. ET-3 es mucho menos potente y sólo ejerce algunos de los efectos de ET-1.

Por otro lado, el veneno de la serpiente, *Atractaspis engaddensis*, contiene un péptido cardiotoxico de 21 aminoácidos llamado sarafotoxina, que tiene homología en la estructura y la función con endotelina (Kloog, 1988).

Las endotelinas (ETs) son secretadas principalmente por el endotelio vascular y ejercen múltiples efectos biológicos, incluyendo una potente vasoconstricción, mitogénesis, estimulación de la expresión de protooncogenes y estimulación de catecolaminas, vasopresina y secreción de aldosterona (Rubanyi, 1994).

Se han identificado dos receptores para ETs, ET-A y ET-B. El receptor de alta afinidad por ET1 y ET2 y baja afinidad por ET3 y sarafotoxina, se llamó ET-A. El receptor con alta afinidad por todas las ETs y sarafotoxina se denominó ET-B (Sakurai, 1991; Arai, 1991).

Se han desarrollado agonistas y antagonistas de los receptores ET-A y ET-B los que resultan ser una herramienta para discriminar el subtipo de receptor a través del cual se ejerce un efecto, entre ellos se encuentran: BQ-123 que es antagonista de ET-A y BQ-788 que es agonista de ET-B.

El subtipo de receptor involucrado en la acción corticotrófica de ETs difiere claramente entre las varias especies de vertebrados estudiados. En la rata, el efecto de ETs está mediado por el subtipo de receptor ET-B, mientras que en la rana está implicado el receptor ET-A. En células adrenocorticales humanas, tanto el subtipo de receptores ET-A como ET-B están involucrados en el efecto corticotrófico de ETs.

La activación de los receptores adrenales causa una elevación de los inositol trifosfatos asociados con un incremento en la concentración del calcio citosólico. Hay hallazgos que indican que ETs estimulan la secreción de aldosterona en células de la zona glomerulosa humana y la secreción de cortisol en células de la zona fasciculata/reticularis humana, actuando a través de receptores ET-A acoplados exclusivamente a una vía dependiente de fosfolipasa C/ proteína quinasa C (PLC/PKC) y de receptores ET-B acoplados tanto a PLC/PKC como a cascadas dependientes de ciclooxigenasa (Andreis, 2002).

También en rata, hay datos que sugieren que ETs estimulan la secreción de aldosterona en células de la zona glomerulosa a través de la activación de receptores ET-B acoplados a PLC. La estimulación de PLC conduce a la activación de PKC y a la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} con la subsecuente activación de calmodulina; el incremento en la concentración de calcio depende exclusivamente de la estimulación de la liberación de calcio de reservorios intracelulares que es dependiente de inositol trifosfatos, IP3 (Andreis, 2001).

ETs, actuando vía receptores ET-A, ejercen un efecto mitótico sobre varios tipos celulares cultivados in vitro (Rubanyi, 1994). Estudios in vivo llevados a cabo en la rata mostraron que ET-1 estimula la hipertrofia y proliferación de células de la glomerulosa (Mazzocchi, 1990; Mazzocchi, 1992; Belloni, 1996). Existen evidencias que indican que las endotelinas estimulan la síntesis de DNA y proliferación celular en glomerulosa de rata a través de receptores ET-A que activan PKC y tirosina quinasas. Estos resultados coinciden con la propuesta que dice que en mamíferos, la zona glomerulosa es la capa proliferativa involucrada en el mantenimiento del crecimiento de toda la corteza adrenal (Mazzocchi, 1997).

1.4 Reguladores de la biosíntesis de glucocorticoides.

La secreción de cortisol o corticosterona está regulada principalmente por ACTH. ACTH es un péptido de 39 aminoácidos producido en el lóbulo anterior de la hipófisis que se sintetiza como parte de un péptido precursor de mayor peso molecular, POMC (pro-opiomelanocortina). Este péptido es también fuente de β -lipotrofina (β -LPH). Además, ACTH y β -LPH son luego procesadas para producir α -MSH (hormona estimulante de melanocito) y β -MSH, γ -LPH, β - y γ -endorfina, y encefalina. El péptido precursor POMC se encuentra en una gran variedad de tejidos extrahipofisarios, incluyendo, el tracto gastrointestinal, numerosos tumores, y testículos. Se secreta en pequeñas cantidades por la hipófisis anterior y no se une significativamente al receptor de ACTH.

CRH es el principal factor hipotalámico que estimula la producción de ACTH por la hipófisis (Itoi, 1998). Vasopresina, un producto peptídico de la hipófisis posterior, también estimula la liberación de ACTH al actuar sinérgicamente con CRH y es un importante regulador fisiológico de ACTH (Scott, 1998). CRH es producido en el núcleo paraventricular del hipotálamo y luego transportado a las células de la hipófisis anterior por un sistema de vasos porta hipofisario. CRH activa la secreción de ACTH vía un receptor específico acoplado a una señalización dependiente de AMPc.

Numerosos factores que producen stress: metabólico, físico o emocional influyen sobre los niveles de secreción de glucocorticoides mediados por ACTH en respuesta a la secreción hipotalámica de CRH y vasopresina. Cortisol/corticosterona es el regulador negativo primario de la actividad del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal a través de un feedback negativo sobre la secreción de ACTH y CRH. Los efectos del feedback negativo del cortisol/corticosterona se extienden tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis.

ACTH actúa a través de un receptor acoplado a proteína Gs incrementando los niveles de AMPc (Mountjoy, 1992). AMPc tiene efectos a corto plazo (minutos a horas) sobre el transporte de colesterol dentro de la mitocondria (Stocco, 1996) y efectos a largo plazo (horas a días) sobre la transcripción de genes que codifican a las enzimas requeridas para la síntesis de glucocorticoides (Waterman, 1997). Los efectos transcripcionales ocurren, al menos en parte, a través del incremento de la actividad de la proteína quinasa A (PKA).

ACTH también tiene efecto sobre la entrada del colesterol desde las lipoproteínas plasmáticas y sobre el tamaño de la glándula adrenal. Además de estos efectos sobre la glándula adrenal, también estimula a los melanocitos y causa hiperpigmentación cuando se secreta en exceso, como ocurre en la enfermedad de Addison.

A pesar que la transcripción de los genes esteroideogénicos en respuesta a ACTH es dependiente de AMPc, la vía consenso de respuesta a AMPc (CRE/CREB) no está involucrada. Cada gen esteroideogénico utiliza secuencias de respuesta a AMPc únicas (CRS) que se encuentran en el promotor de cada

gen, las cuales unen distintas combinaciones de factores de transcripción (Sewer, 2003)

El ácido araquidónico también ha sido involucrado en la respuesta de ACTH. El ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos (prostaglandinas, leucotrienos y epóxidos) juegan roles críticos en la iniciación o modulación de un amplio espectro de repuestas fisiológicas y ciertos procesos anormales en células de mamíferos (Needleman, 1986; Smith, 1989). AA no se almacena libremente en la célula, sino esterificando a fosfolípidos principalmente en la posición *sn*-2 (Gelb, 1994). Se han propuesto varias vías diferentes para la movilización de AA, incluyendo fosfolipasa C en conjunto con glicerol lipasas, lisofosfolipasa y fosfolipasa A2. Recientemente, se propuso un mecanismo nuevo para la liberación de AA. Este mecanismo involucra la liberación de AA por hidrólisis de la unión tioéster del ácido graso a la coenzima A (CoA) (Finkielstein, 1998) por una tioesterasa con especificidad para ácidos grasos de cadena muy larga (Svensson, 1995). Se aisló (Paz, 1994), clonó y secuenció (Finkielstein, 1998) una fosfoproteína de 43 KDa, pp43, que juega un rol importante en la activación de la esteroidogénesis a través de la liberación de AA en células de la zona fasciculata de adrenal. Esta proteína, que se localiza en la membrana interna mitocondrial (Podestá 2002), ha sido caracterizada como una tioesterasa usando araquidonil-CoA como sustrato y se la llamó tioesterasa relacionada al ácido araquidónico involucrada en la esteroidogénesis (ARTIS_t, del inglés: arachidonic acid-related thioesterase involved in steroidogenesis). La actividad de ARTIS_t es dependiente de AMPc y PKA y bloqueada por el uso de inhibidores de la liberación AA. Esta inhibición puede revertirse por el agregado de AA (Podestá 2002), lo que indica que esta proteína regula la síntesis de esteroides a través (directa o indirectamente) de la activación de la liberación de AA.

Por otro lado, se ha descrito la actividad de diferentes isoformas de acil-CoA sintetasa y se ha informado la existencia de una acilcoA-sintetasa que utiliza preferentemente AA (AA-preferring acil-CoA sintetasa) llamada ACS4 en los tejidos esteroidogénicos. Surgió entonces la pregunta de si AA-CoA, acil-CoA sintetasa y la tioesterasa son esenciales para la liberación de AA y el metabolismo del colesterol adrenal. Resultados recientes (Maloberti, 2002) son consistentes con la participación de una acil-CoA sintetasa y una acil-CoA

tioesterasa como importantes reguladores de la liberación de AA involucrado en el metabolismo de colesterol estimulado por hormonas tróficas.

De acuerdo con varios estudios, la vía de señalización del ácido araquidónico es diferente de la vía de fosforilación AMPc-PKA. Estas dos vías de señalización son requeridas para la co-regulación de la expresión del gen StAR y la producción de esteroides y ninguna de las dos, por sí solas, son suficientes para una respuesta máxima (Wang, 2000; Wang, 1999). Más aún, la interacción sinérgica entre el AA y el AMPc incrementan la sensibilidad de la esteroidogénesis a la estimulación de hormonas tróficas (Wang, 2002). Con el objeto de entender aún más la naturaleza de la vía de señalización del AA, se investigaron las secuencias del DNA del promotor de StAR (Wang, 2003), y se encontró una región en el promotor que respondió al tratamiento con AA. También, se separaron e identificaron por HPLC metabolitos del AA, ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) y ácido 5-hidroxeicosatetraenoico (5-HETE), inducidos por AMPc. Los resultados indicaron que los metabolitos de AA producidos por 5-lipoxigenasa están involucrados en la señalización inducida por hormonas tróficas y estimulan la expresión del gen StAR y la biosíntesis de hormonas esteroideas.

1.5 Camino metabólico del Hemo

Los citocromos P450 esteroideogénicos son holoenzimas que se caracterizan por tener al hemo como grupo prostético.

El hemo es un tetrapirrol cuya biosíntesis involucra ocho enzimas, cuatro de las cuales son citoplasmáticas y las otras cuatro se localizan en la mitocondria (Figura 4). El primer paso de esta biosíntesis ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de succinil-CoA y glicina para formar el ácido δ -aminolevulínico (ALA). Esta reacción está catalizada por ALA-sintasa (ALA-s), que es la enzima de velocidad limitante de este camino metabólico. Los siguientes cuatro pasos de la biosíntesis tienen lugar en el citosol.

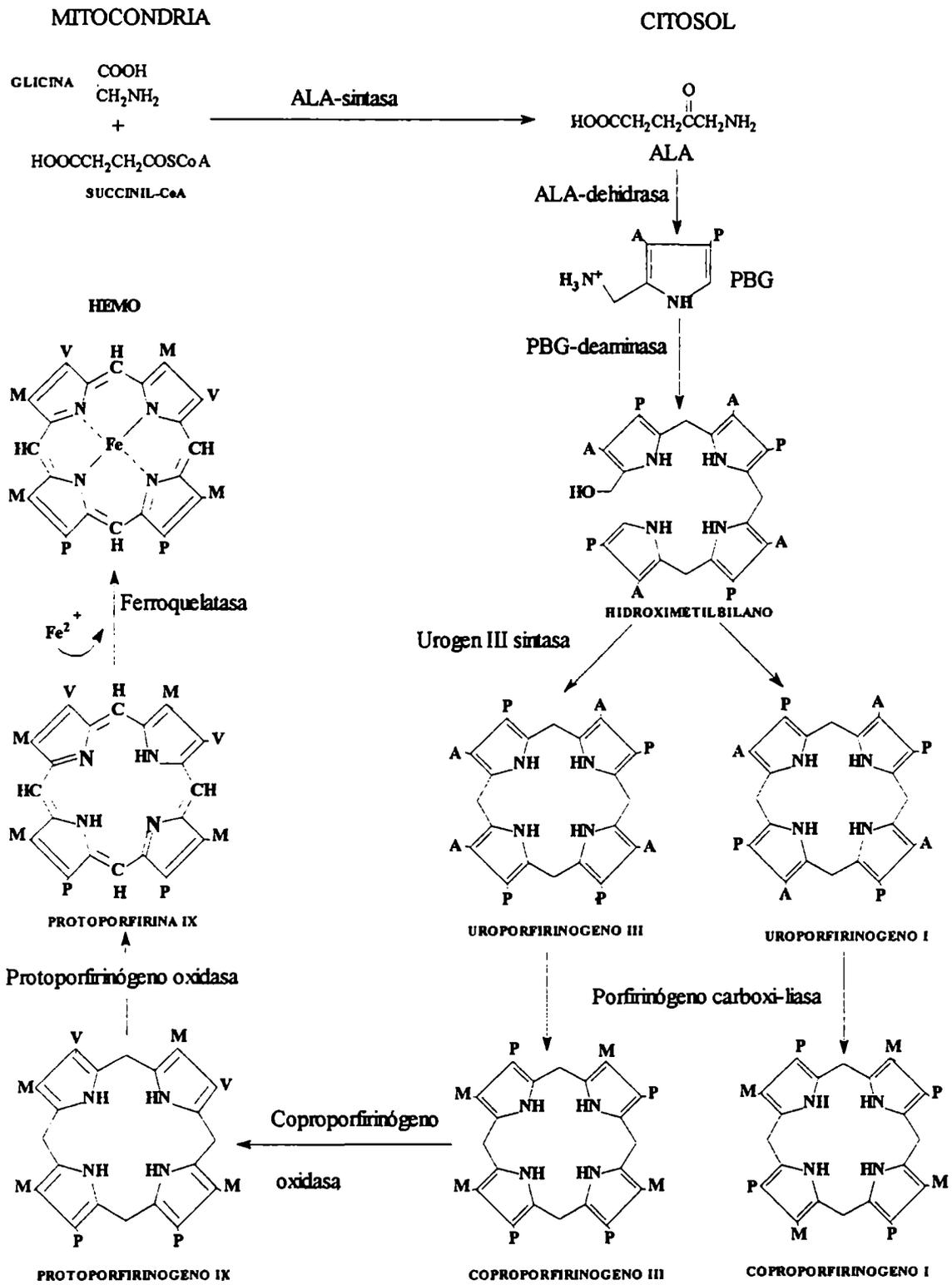


Figura 4: Camino metabólico del hemo.

ALA: ácido δ -aminolevulínico, PBG: porfobilinógeno, Urogen III: uroporfirinógeno III, A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$, P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, M: $-\text{CH}_3$ y V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$

ALA-dehidrasa (ALA-d) convierte dos moléculas de ALA en un monopirrol, el porfobilinógeno (PBG). Los dos pasos enzimáticos siguientes convierten cuatro moléculas de PBG en el tetrapirrol cíclico uroporfirinógeno III, en el cual ocurre una inversión de una de las moléculas de PBG agregadas por acción de la urogen III sintasa, en su ausencia se formaría uroporfirinógeno I (Figura 4). El uroporfirinógeno III es luego descarboxilado para formar coproporfirinógeno III. Los tres pasos finales del camino biosintético ocurren en la mitocondria y son la descarboxilación oxidativa de coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX catalizada por la coproporfirinógeno oxidasa, seguida por la oxidación de protoporfirinógeno a protoporfirina IX catalizada por la protoporfirinógeno oxidasa y finalmente la inserción de hierro ferroso en el anillo tetrapirrólico de protoporfirina IX catalizado por la ferroquelatasa.

1.5.1 ALA-s.

δ -aminolevulinato sintasa (ALA-s) es una enzima de matriz mitocondrial que en animales, hongos y algunas bacterias cataliza el primer paso que es el limitante de la velocidad del camino biosintético del hemo (Ades, 1990; Ferreira, 1995 a). Como se mencionó anteriormente ALA-s cataliza la condensación de glicina y succinil-CoA para forman el primer metabolito específico de esta biosíntesis, el ácido δ -aminolevulínico.

ALA-s es sintetizada como un precursor, pre-ALA-s, el cual es luego transferido al interior de la matriz mitocondrial, generándose en dicho proceso el ALA-s madura (Kikuchi, 1982; Kappas, 1983).

ALA-s es un homodímero dependiente del 5'-fosfato de piridoxal con subunidades de 56 KDa y el sitio activo localizado en la interfase del dímero (Tan, 1996). Las cinéticas del estado estacionario (steady-state) de las reacciones catalizadas por ALA-s siguen un mecanismo ordenado Bi-Bi, en el cual la glicina se une primero, segundo la succinil-CoA, y al final se libera ALA (Fanica-Gaignier, 1973).

Hay dos isoenzimas de ALA-s, que están codificadas por dos genes separados localizados en diferentes cromosomas. La enzima constitutiva,

también llamada ALA-s hepática, se expresa en todos los tejidos pues todas las células animales sintetizan hemo para las distintas hemoproteínas, entre ellas, los citocromos mitocondriales. La segunda isoenzima es una enzima específica de células eritroides, cuya síntesis está incrementada durante la eritropoyesis para satisfacer la demanda de hemo requerida para la producción de hemoglobina (Kappas, 1995; May, 1995). Los dos genes que codifican para las dos ALA-s humanas fueron asignados al cromosoma 3 (Bishop, 1990) y al cromosoma X (Cotter, 1992) para la enzima constitutiva y la específica de células eritroides, respectivamente.

El hemo controla su propia biosíntesis regulando la actividad de ALA-s hepática a través del "pool" de hemo libre; a medida que el "pool" de hemo libre disminuye, la actividad de ALA-s se incrementa (Kappas, 1995).

El rol regulatorio de ALA-s queda de manifiesto pues el mRNA de ALA-s esta incrementado cuando aumenta la demanda de hemo en condiciones fisiológicas mientras que los niveles de expresión de las otras enzimas del camino biosintético del hemo no se alteran significativamente (May, 1995).

Por el contrario un aumento del contenido de hemo, disminuye ALA-s por distintos mecanismos. El hemo regula la translocación de la pre-ALA-s inactiva desde el citosol al interior de la mitocondria, donde ALA-s es activa (Hayashi, 1983). Un motivo regulatorio de hemo, presente en las presecuencias de precursores de ALA-s, mostró mediar la inhibición del importe a la mitocondria de la proteína precursora en presencia de hemo. Un segundo mecanismo de control involucra la inhibición por el hemo de la transcripción del gen de ALA-s (Srivastava, 1988; Iwasa, 1989) y también se ha informado reducción de la estabilidad del mRNA de ALA-s por hemo (May, 1995).

1.5.2 Ferroquelatasa.

La ferroquelatasa es la última enzima del camino biosintético del hemo y cataliza la quelación del hierro ferroso en el anillo de protoporfirina IX para formar protohemo. Es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza pues esta presente en distintos organismos, desde bacterias hasta el hombre.

Se encontró que la ferroquelatasa, con excepción de la de *Bacillus subtilis*, es una proteína asociada con la membrana plasmática en procariotes y con la membrana interna de la mitocondria en eucariotes superiores con su sitio activo de frente a la matriz mitocondrial (Ferreira, 1995 b).

Como la mayoría de las proteínas mitocondriales, la ferroquelatasa de eucariotes se sintetiza en el citosol como un precursor más grande y luego se importa a la mitocondria donde es procesada a la forma madura.

En 1994, se estableció que la ferroquelatasa de mamíferos es una metaloproteína, con la identificación de un grupo prostético nuevo que contiene hierro y azufre [2Fe-2S] (Ferreira, 1994; Dayley, 1994).

1.6 Porfirias

Las porfirias son un grupo de enfermedades asociadas a defectos en la biosíntesis del hemo. Una deficiencia en una de las ocho enzimas involucradas en esta síntesis puede llevar a una variedad de síntomas clínicos. La clasificación depende de la enzima deficiente. Las porfirias son frecuentemente mal diagnosticadas porque los pacientes tienen síntomas poco específicos. Sin embargo, las formas agudas de la enfermedad pueden ser fatales, por lo que es necesario hacer un diagnóstico preciso e iniciar un tratamiento apropiado. La mayoría de las porfirias tienen una herencia autosómica dominante aunque algunas son recesivas y otras se adquieren por exposición a drogas porfirinogénicas (Foran, 2003).

1.7 Drogas porfirinogénicas

Los compuestos que interfieren con el control de la síntesis de hemo y permiten la acumulación de porfirinas se conocen como drogas porfirinogénicas.

Los efectos porfirinogénicos de varios compuestos dependen de su capacidad de inactivar citocromos P450.

Un grupo de drogas porfirinogénicas es ejemplificado por 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC). Los compuestos heterocíclicos de este grupo causan una inactivación basada en el mecanismo del citocromo P-450, pues luego de ser biotransformados por el citocromo P450, forman intermediarios reactivos en el sitio activo del citocromo P450, los cuales reaccionan con el grupo hemo provocando la N-alquilación de un anillo pirrólico (Marks, 1988, Ortiz de Montellano, 1995). Se inactiva el citocromo P450, se disocia el hemo y luego pierde el hierro para dar N-alquilprotoporfirina IX (N-APP), que son potentes inhibidores de ferroquelatasa. La inhibición de ferroquelatasa resulta en menor producción de hemo y aumento de ALA-s, lo que provoca acumulación de porfirinas (De Matteis, 1996).

Alilisopropilacetamida (AIA) ejemplifica un segundo grupo. Tales compuestos contienen un grupo olefínico o acetilénico, que causan inactivación del citocromo P-450, se destruye el hemo del citocromo P-450 y se producen N-APP que no inhiben ferroquelatasa, en este caso, la inactivación del hemo del citocromo requiere su reemplazo por nuevo hemo lo que hace disminuir el contenido del hemo libre regulatorio y aumentar ALA-s (Ortiz de Montellano, 1985).

Un tercer grupo es ejemplificado por los hidrocarburos aromáticos policíclicos o polihalogenados. Estos compuestos inducen a las isoenzimas citocromos P-450 específicas pero son sustratos pobres. Hay un aumento en la generación de especies activas de oxígeno, las cuales interactúan con un sustrato endógeno para formar un inhibidor de la porfirinógeno carboxilasa. Es también posible que las drogas porfirinogénicas ejerzan un efecto directo sobre el núcleo para incrementar la formación del mRNA de ALA-s (Marks, 1988).

1.8 Glicosilfosfatidilinositales

Los glicosilfosfatidilinositales (GPIs) fueron originariamente descubiertos en eucariotes por estar unidos covalentemente a glicoproteínas de la superficie celular y se vió que constituían un modo alternativo de anclaje de proteínas a membrana plasmática (Ferguson, 1988).

Estas proteínas ancladas por GPI tienen la estructura general proteína-etanolamina-P-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6myo-inositol-1-P-lipido, donde EtNP, Man y GlcN son fosfoetanolamina, manosa y glucosamina respectivamente. Esta estructura representa la secuencia mínima del GPI que se conserva en todas las células eucariotas (Kinoshita, 1997) y el extremo carboxílico de la proteína está unido por un enlace amida a la etanolamina del GPI (Figura 5).

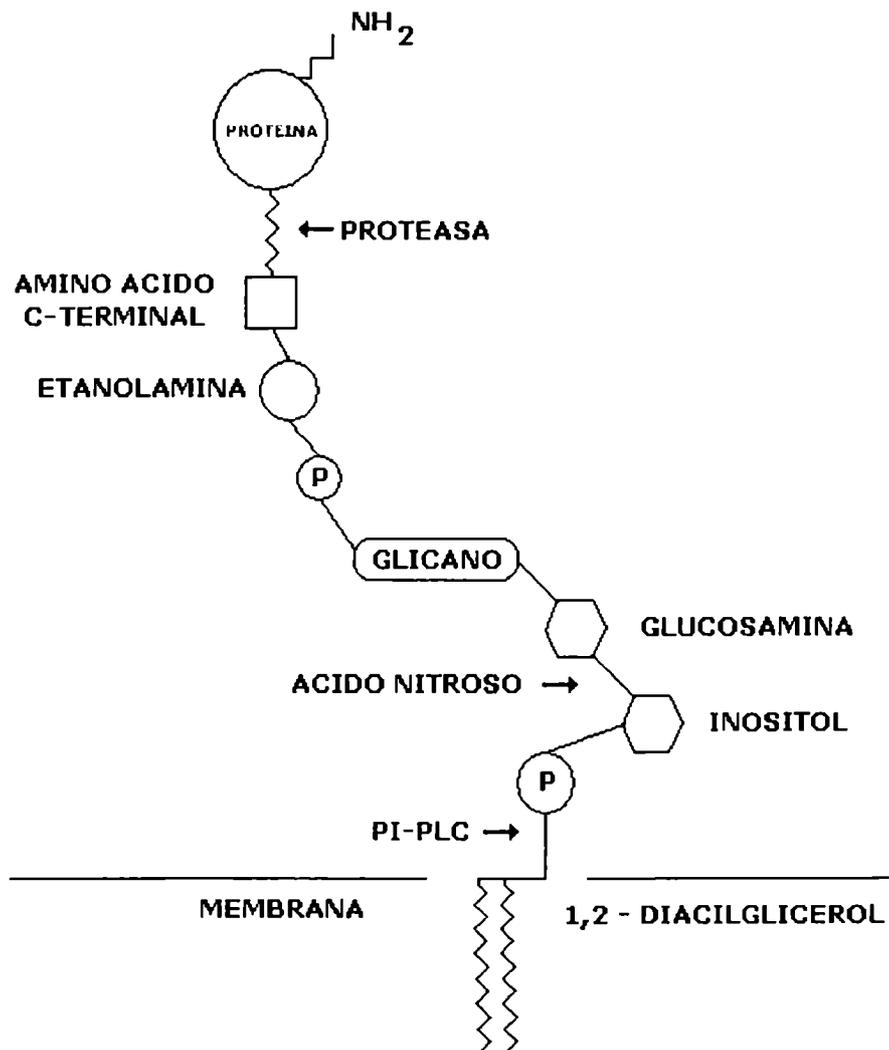


Figura 5. Estructura esquemática de una proteína con ancla de GPI. Se indican los lugares de corte por tratamiento con fosfolipasa C, ácido nitroso y proteasas.

Los GPIs también pueden estar como glicolípidos libres en las células. El contenido de GPIs libres varía en los distintos tipos celulares y pueden ser precursores de anclas de proteínas o intermediarios de la biosíntesis y también han sido propuestos como fuente de segundos mensajeros intracelulares (Sing, 1996; Jones, 1998).

1.8.1 Heterogeneidad en las estructuras de GPI

La porción conservada del GPI que se muestra en la Figura 5, puede presentar algunos agregados que son variables en las distintas anclas de proteínas estudiadas. Esto hace que la familia de moléculas de GPI sea estructuralmente heterogénea. La heterogeneidad puede basarse tanto en diferencias en la estructura del glicano como del lípido.

Respecto del glicano las modificaciones pueden incluir: a) la adición de: galactosa, VSG (Ferguson, 1988 a) ; otras manosas, Thy-1 (Homans, 1988); n-acetilgalactosamina, Thy-1 (Hirose, 1991); ácido siálico, anclas de proteínas de priones (Stahl, 1992), dipeptidasa de riñón porcino (Brewis, 1995) y PARP de *Trypanosoma brucei*; b) la adición de más etanolamina fosfato, Thy-1 (Homans, 1988), acetilcolinesterasa eritrocitaria (Roberts, 1988a) y c) la acilación del inositol, acetilcolinesterasa eritrocitaria.

El lípido presente en los GPIs, puede variar, habiéndose determinado la presencia tanto de glicerolípidos como de esfingolípidos.

Las anclas de GPI de proteínas de mamífero presentan mayoritariamente alquil-glicerolípidos (McConville, 1993). Se han encontrado sn-1-alquil-2-acil gliceroles en acetilcolinesterasa eritrocitaria humana (Roberts, 1988), fosfatasa alcalina de placenta humana (Redman, 1994) y otras proteínas de mamífero (McConville, 1993), así como en algunos parásitos como *L. major* (Schneider, 1990) y *Trypanosoma cruzi* (Heise, 1995).

Existen anclas con sn-1,2-diacilgliceroles en VSG de *Trypanosoma Brucei* (Ferguson, 1985), acetilcolinesterasa de Torpedo (Butikofer, 1990) y CD52 humana (Treumann, 1995) y con sn-1-acil-2-lisogliceroles en PARP de *T. Brucei* (Field, 1991).

En cuanto a los esfingolípidos, se ha visto que ciertas anclas de *Trypanosoma cruzi* (Bertello, 1996; Serrano, 1995) de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Dictyostelium discoideum*, presentan ceramidas en la porción lipídica (Frankhauser, 1993).

1.8.2 Biosíntesis de GPI

Se ha visto que la falta de biosíntesis de GPI en ratones resulta en la muerte debido a una embriogénesis anormal (Nozakiet, 1999) pero a nivel celular el GPI no es esencial pues se han informado varias células mutadas deficientes en la biosíntesis de GPI (Hyman, 1988).

La presencia en los GPIs de una estructura conservada a lo largo de la evolución sugiere que la maquinaria de biosíntesis también debe haberse conservado.

La biosíntesis de GPI involucra la adición secuencial de monosacáridos y fosfoetanolamina (EtN-P) a fosfatidilinositol (PI) formando la estructura mínima EtN-P-Man₃GlcN-PI.

La síntesis de las anclas de GPI en células de mamíferos es iniciada en la cara citosólica del retículo endoplásmico (RE) (Vidugiriene, 1993) con la formación de N-acetil-glucosamina-PI (GlcNAc-PI) a partir de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) y PI (Doering, 1989), la cual luego de ser desacetilada para dar glucosamina-PI (GlcN-PI), es acilada en el inositol (Urakaze, 1992), a continuación, se adicionan 3 manosas y 1 o más EtN-P se unen a las manosas (Puoti, 1991; Hirose, 1992; DeLuca, 1994).

Una vez que la EtN-P de la manosa terminal es agregada, la estructura completa de GPI (Ueda, 1993) puede ser adicionada covalentemente a proteínas secretorias que tienen la secuencia señal C-terminal apropiada (Udenfriend, 1995).

Las proteínas ancladas a la superficie celular por GPI son generalmente sensibles a fosfolipasa C (PLC), por ello la liberación de una proteína al medio extracelular por tratamiento con PLC es un criterio para determinar la presencia de ancla de GPI.

Por el contrario los precursores del ancla de GPI presentes en el RE son resistentes a PLC por la presencia de un grupo acilo en la posición 2 del inositol (Hirose, 1992)

El anillo de inositol es acilado en un paso temprano de la biosíntesis de GPI por PIG-W, una aciltransferasa que incorpora un grupo palmitoilo al inositol de glucosaminilfosfatidilinositol, GlcN-PI, que es el segundo intermediario del camino (Murakami, 2003). La acilación del inositol es crítica para la incorporación de GPI en las proteínas pues células mutantes deficientes en PIG-W expresan sólo niveles muy bajos de proteínas con ancla de GPI (Murakami, 2003).

Inmediatamente después del agregado de GPI a la proteína el inositol es generalmente desacilado en el RE y se transforma en sensible a PI-PLC (Chen, 1998).

Los eritrocitos humanos son una excepción, pues en todos los GPI permanece acilado el inositol y las proteínas con esta ancla son resistentes a PLC (Deeg, 1992).

Acaba de ser clonada en mamíferos una deacilasa del inositol de GPI utilizando una línea de células CHO deficientes en esta deacilasa (Satoshi, 2004). El gen que revirtió esta falla se denominó PGAP1 (del inglés: post GPI attachment to proteins 1). Es una proteína de 922 aminoácidos asociada al RE y su actividad es importante para garantizar un transporte eficiente de las proteínas con ancla de GPI desde el RE al Golgi.

La biosíntesis de GPI esta bastante conservada en los diferentes organismos aunque existen algunas diferencias (Ferguson, 1999 b). En particular, como veremos más abajo, la manosiltransferasa que adiciona la primera manosa (GPI-MT-I) en mamíferos y protozoos tienen diferente especificidad por sustrato y por ello, son blancos de inhibidores de la biosíntesis de GPI específicos de especie.

Las tres manosas en el GPI provienen de dolicol-fosfato-manosa y estan unidas a través de diferentes enlaces, por lo tanto, tres manosiltransferasas dependientes de dolicol-fosfato-manosa diferentes son requeridas para adicionar cada una de las manosas al GPI.

Las primeras dos reacciones en la biosíntesis de GPI ocurren en la cara citosólica de la membrana del RE. Esto fue establecido determinando la

orientación de los dos primeros intermediarios de biosíntesis, GlcNAc-PI y GlcN-PI (Vidugiriene, 1993) y las primeras dos enzimas del camino: GPI-GlcNAc transferasa y GlcNAc-PI deacetilasa.

Mientras que las dos reacciones iniciales que originan GlcN-PI tienen lugar en la cara citosólica de la membrana del RE, el GPI es transferido a las proteínas en la cara luminal (Kinoshita, 1997). Es decir que debe ocurrir un movimiento en algún paso de la biosíntesis del GPI desde la cara citosólica a la luminal del RE (movimiento conocido como "flipping"). La determinación del lugar donde se encuentran las distintas enzimas de esta biosíntesis permite aclarar este punto.

El intermediario de la biosíntesis de GPI que acepta la primera manosa es diferente en células de mamífero y *Trypanosoma brucei*. En *T. brucei* la primera manosa se incorpora en GlcN-PI, mientras que en mamíferos se incorpora en GlcN-PI-acilo, que tiene un grupo acilo en el anillo de inositol (Smith, 1997).

Se encontró que en mamíferos la primera manosilación ocurre en la cara luminal del RE y lo mismo parece ocurrir en *T. brucei* (Maeda, 2001).

Como la primera manosa en células de mamífero es transferida a GlcN-PI-acilo en la cara luminal del RE, este intermediario debe estar orientado hacia la cara luminal. Teniendo en cuenta que las dos reacciones iniciales que originan GlcN-PI tienen lugar en la cara citosólica de la membrana del RE, GlcN-PI o GlcN-PI-acilo debe translocar a la cara luminal.

Sin embargo, se ha informado muy recientemente que la acilación del inositol en mamíferos no es esencial para la manosilación, indicando que GlcN-PI puede moverse desde la cara citosólica a la cara luminal del RE (Murakami, 2003).

Es decir que en células de mamíferos la biosíntesis de GPI comenzaría en la cara citosólica del RE y cambiaría a la cara luminal inmediatamente antes de la generación de GlcN-PI-acilo, desde donde continuaría en la cara luminal hasta la incorporación del GPI en proteínas.

Las anclas de GPI se adicionan a proteínas presentes en el retículo endoplásmico que tienen una secuencia señal en el extremo C-terminal para la adición de GPI. La secuencia señal para el GPI consiste en un triplete de aminoácidos pequeños, denominados ω , $\omega+1$ y $\omega+2$, una secuencia hidrófila

espaciadora de 7-10 aminoácidos y un segmento hidrofóbico C-terminal (Udenfriend, 1995).

El aminoácido ω es el sitio de adición del GPI. La adición del GPI a la proteína es catalizada por una GPI transamidasa (GPIT), un complejo proteico multimérico unido a la membrana del RE (Hamburger, 1995; Benghezal, 1996; Hiroi, 1998; Ohishi, 2000; Ohishi, 2001; Fraering, 2001; Hong, 2003; Ohishi, 2003; Nagamune, 2003).

La GPIT de mamíferos consta de al menos 5 subunidades: Gaa1, Gpi8, PIG-S, PIG-T y PIG-U y todas ellas son necesarias para cumplir su función (Hiroi, 1998; Ohishi, 2000; Ohishi, 2001; Hong, 2003).

La biosíntesis de GPI puede ser reproducida en sistemas libres de células usando lisados de células o fracciones de membrana suplementadas con metabolitos solubles apropiados como UDP-NAcGlc y GDP-manosa. Los trabajos iniciales con fracciones de membrana de *Trypanosoma brucei* mostraron que es posible sintetizar distintos GPIs desde GlcNAc-PI hasta precursores de anclas de proteína que contienen fosfoetanolamina (Masterson, 1989; Menon 1990).

El estudio de la síntesis de GPI en moléculas de mamífero permitió explicar la enfermedad conocida como hemoglobinuria nocturna paroxismal a nivel molecular. En esta enfermedad, los glóbulos rojos son destruidos por el complemento debido a la falta de moléculas, como CD59 y factor de aceleración del decaimiento, que regulan la actividad del complemento y son ancladas por GPI. La falla metabólica en las células progenitoras es la incapacidad de sintetizar el primer intermediario en la biosíntesis de GPI, es decir, la transferencia de NAcGlc al fosfatidilinositol para dar N-acetilglucosaminil-PI, GlcNAc-PI, debido a mutaciones en el gen que expresa la subunidad catalítica del complejo de la transferasa de NAcGlc (Bessler, 1994).

1.8.3 Proteínas con ancla de GPI identificadas

GPIs es un glicolípido que ancla a la membrana muchas proteínas de la superficie celular en eucariotes (Tiede, 1999; McConville, 2000).

GPI es ancla de proteínas con variadas funciones como puede ser: proteínas que participan de la respuesta immune, proteasas, receptores, moléculas de adhesión e hidrolasas de superficie.

Las proteínas con anclas de GPI estudiadas incluyen: Proteína variante de superficie de *Trypanosoma brucei*, glicoproteínas tipo mucina de la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*, trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, MSP-1 y MSP-2 de *falciparum*, gp 63 de *Leishmania*, Thy-1, acetilcolinesterasa, CD14, CD52, CD55, CD59 y fosfatasa alcalina en mamíferos entre otras.

Se han caracterizado, parcial o completamente, las estructuras de las anclas de algunas de estas proteínas, incluyendo la glicoproteína variable de superficie, VSG, (Ferguson, 1988 a) y la proteína repetitiva ácida, PARP, (Field, 1991) de *Trypanosoma brucei*; la proteasa de superficie de promastigotes, gp63, de *Leishmania major* (Schneider, 1990); el antígeno 1G7 (Guther, 1992) y la glicoproteína Tc85 (Couto, 1993) de *Trypanosoma cruzi*; el antígeno específico de pre-espora de *Dictyostelium discoideum* (Haynes, 1993) y la acetilcolinesterasa del órgano eléctrico de *Torpedo californica* (Mehlert, 1993). En mamíferos se han determinado las estructuras completas de las anclas de varias proteínas diferentes: el antígeno Thy-1 de cerebro de rata (Homans, 1988), acetilcolinesterasa eritrocitaria humana (Roberts, 1988a; Deeg, 1992), proteína prión de cerebro de hámster (Stahl, 1992), 5'-nucleotidasa de hígado bovino (Taguchi, 1994), fosfatasa alcalina de placenta humana (Redman, 1994), CD59 urinaria humana (Nakano, 1994), la molécula de adhesión de neuronas de músculo esquelético murino (NCAM) (Mucasa, 1995), CD52 de bazo humano (Treumann, 1995) y la dipeptidasa de riñón porcino (Brewis, 1995).

Las proteínas ancladas por GPI son abundantes en parásitos como *Trypanosoma brucei* (McConville, 1993). La superficie de la forma del parásito presente en el torrente sanguíneo está cubierta de 10 millones de moléculas de la proteína variante de superficie, VSG, que es anclada por GPI (Ferguson 1999). La biosíntesis de GPI es esencial para esta forma del parásito (Nagamune, 2000).

1.8.4 Liberación por fosfolipasas de las proteínas con ancla de GPI

La evidencia que varias proteínas marcadoras de membrana plasmática como 5'-nucleotidasa y fosfatasa alcalina son proteínas ancladas por GPI y no proteínas transmembrana llevó a los investigadores a re-evaluar el modo de anclaje de varias proteínas de la superficie celular.

Low and Ikesawa habían desarrollado un método para el tratamiento de células o preparaciones de membranas con fosfolipasa C de fosfatidilinositol (PI-PLC) bacteriana que se convirtió en una prueba rutinaria para evaluar la presencia de proteínas ancladas por GPI (Taguchi, 1985; Koch, 1986).

La identificación de estas proteínas también fue facilitada por otro producto surgido de la investigación en trypanosoma: anticuerpos contra el denominado determinante de reacción cruzada (CRD). Estos anticuerpos reconocen epitopes presentes en diferentes variantes de VSG soluble localizados en el hidrato de carbono del GPI (Zamze, 1988).

Uno de estos epitopes contiene el inositol 1,2-fosfato cíclico generado a partir de GPI después del corte con PLC. Por lo tanto, el pasaje de CRD negativo a CRD positivo después del tratamiento con PLC es otra prueba evidente de la presencia de un ancla de GPI. Aunque, desafortunadamente, no todos los GPI son sensibles a PLC. El grupo de Rosenberry fue el primero en mostrar que algunos GPI son resistentes al tratamiento con PI-PLC porque tienen un ácido graso extra (generalmente palmitato) unido al anillo de inositol (Roberts, 1988a; Roberts, 1988b) en la posición 2 (Treumann, 1995).

En la Figura 5 se muestra la hidrólisis de un GPI, cuyo lípido es un glicerolípidio, por fosfolipasa C. Por hidrólisis de GPI con PLC se genera

inositolfosfoglicano (IPG), que posee un fosfato cíclico, y el lípido (por ejemplo, diacilglicerol). En cambio, por hidrólisis con una fosfolipasa de tipo D se produce la ruptura del enlace entre el fosfato y el inositol y se formarían como productos, ácido fosfatídico (PA) y un inositol glicano (IG). En ambos casos se obtiene un producto lipídico y otro soluble en agua.

Del mismo modo, estas enzimas hidrolizan GPIs que contienen ceramida; en este caso, los lípidos liberados por (G)PI-PLC o GPI-PLD serían ceramida o ceramida 1-fosfato, respectivamente.

Como se ha comentado anteriormente, en la estructura de las anclas de GPI puede encontrarse acilado el inositol. Esta modificación le confiere, a las anclas de GPI, resistencia a la hidrólisis por fosfolipasas de tipo C (Roberts, 1987; Roberts, 1988 b; Ferguson, 1992; Stevens, 1995) pero no afecta la susceptibilidad a las hidrolasas de tipo D (Guther, 1994).

Las fosfolipasas C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC) disponibles comercialmente que son de origen bacteriano (*Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*) han resultado una herramienta imprescindible para el descubrimiento y la caracterización de las anclas de GPI (Fergusson, 1988 b; Low, 1988 a).

Más recientemente se ha descubierto la existencia de fosfolipasas de tipo C y D específicas de GPI (GPI-PLC y GPI-PLD).

Se purificaron enzimas del tipo de GPI-PLC de *Trypanosoma brucei* (Fox, 1986) y de hígado de rata (Fox, 1987). En *Trypanosoma brucei*, la enzima, que ya ha sido clonada (Carrington, 1989), sería la responsable de la desaparición de la proteína VSG de la cubierta del trypanosoma para pasar a la forma del parásito presente en el tracto del insecto (Bulow, 1985).

Se ha aislado, clonado y secuenciado una fosfolipasa D específica de GPI (GPI-PLD) de mamíferos (LeBoeuf, 1998; Metz, 1992), la cual existe predominantemente como proteína soluble en plasma (Davitz, 1989; Huang, 1990; Scallon, 1991), aunque se ha descrito también una forma asociada a la célula (Metz, 1994). Esta fosfolipasa ha sido bien estudiada (Hari, 1996), la estructura mínima requerida para el reconocimiento del sustrato es glucosamina unida a fosfatidilinositol (Deeg, 1995).

1.8.5 Distintas funciones de GPI

Como hemos visto, los GPIs tienen una estructura básica que ha sido conservada durante la evolución lo cual se condice con el rol crítico del GPI en el desarrollo y la diferenciación. GPIs de diferentes especies o tipo celular pueden variar en el tipo de lípido, residuos adicionales de azúcares y etanolaminafosfatos unidos a la estructura conservada del glicano. Estas variaciones le confieren diversidad estructural y de propiedades lo que permite un amplio rango de funciones biológicas.

Los GPIs han sido involucrados en distintas funciones como: señal para dirigir proteínas a la membrana apical en células polarizadas, señales transmembrana, mimetizantes de la acción de insulina (McConville, 1993; Ferguson, 1999 a; Ferguson, 1999 b; Ferguson, 1994; Field, 1997). También los GPIs participan en las interacciones célula a célula y son importantes en la embriogénesis, desarrollo y diferenciación (Kinoshita, 1997). Las proteínas con anclas de GPI se localizan en microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos conocidos como "lipid-rafts". Esta ubicación puede estar relacionada con su participación en procesos de traducción de señales. Recientemente, se ha acumulado evidencia que indica que algunas moléculas conocidas por su participación en señales, como ciertas quinasas, están enriquecidas en estas estructuras. Actualmente se está estudiando la manera en que estos dominios se comunicarían con la maquinaria de señales intracelulares (Muller, 2002).

1.8.5.1 Participación de GPI en procesos infecciosos

El parásito *Plasmodium falciparum* es uno de los plasmodium más virulentos y responsable de más del 95% de las muertes por malaria en el mundo. Varios estudios atribuyen la malaria falciparum a componentes del parásito que inducen la producción de $\text{TNF}\alpha$ y otras citoquinas pro-inflamatorias que son responsables de varias manifestaciones clínicas como: fiebre, hipoglucemia, diseritropoiesis y daño vascular en órganos vitales (Clark,

1989). Esta hipótesis está de acuerdo con los niveles elevados de $TNF\alpha$ en los fluidos cerebrales de los pacientes que sufren de malaria cerebral letal (Kwiatkowski, 1990) y la capacidad de anticuerpos anti- $TNF\alpha$ de impedir el desarrollo de la patología cerebral letal en animales de experimentación (Grau, 1987).

Schofield and Hackett (Schofield, 1993) propusieron que los GPIs de *Plasmodium falciparum* eran los compuestos responsables de la patogénesis de la malaria. Esta idea se basa en la capacidad de los GPIs de producir $TNF\alpha$, IL-1, $IFN-\gamma$ en macrófagos y causar síntomas similares a la enfermedad incluyendo: pirexia, hipoglucemia y caquexia en animales (Schofield, 1993). También se vió que los GPIs del parásito inducen la expresión de nitric sintetasa y aumentan los niveles de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y e-selectina sobre la superficie de células endoteliales a través de la activación de kinasas de tirosina de proteínas (PTK) y PKC (Schofield, 1996; Tachado, 1996). Estas respuestas inmunes pueden aumentar sinérgicamente las funciones fisiológicas vitales en el huésped llevando a severas complicaciones de salud. Por eso los GPIs de *P. falciparum* han sido llamados los "factores patogénicos" de la malaria (Schofield, 1993)

Otras proteínas con ancla de GPI asociadas a procesos infecciosos son los priones. Los priones se encuentran virtualmente en todas las especies y para la mayor parte de ellas, son inocuos. Sin embargo, ciertos eventos, tales como una mutación o exposición a material infectado, causa un cambio conformacional en la proteína que la hace extremadamente infectiva. Este cambio, desde una conformación de α -hélice (PrP^c) a lámina β (PrP^{sc}), es todo lo que distingue el prión normal de la versión infectiva anormal.

Las encefalopatías espongiformes tales como "scrapie" en la oveja, la encefalitis espongiforme bovina (BSE) en el ganado vacuno y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD) y el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) en humanos son causadas por este agente transmisible designado prión. La hipótesis de "proteína solamente" propone que el prión consiste parcialmente o enteramente de una isoforma conformacional de la proteína normal huésped PrP^c , designada PrP^* , y que el conformero anormal, cuando se introduce en el organismo, causa la conversión de PrP^c . PrP^* puede

coincidir con PrP^{sc}, un confórmero agregado resistente a proteasas de PrP que se acumula principalmente en el cerebro de casi todos los organismos infectados por priones. PrP^c consiste de una mitad N-terminal flexible, que comprende repeticiones de un octapéptido que une Cu²⁺ y un dominio globular que consiste de tres α -hélices, una hoja β antiparalela corta y un único enlace disulfuro. Está anclado del lado externo de la superficie celular por un glicosil fosfatidilinositol (GPI) y está presente en casi todos los tejidos, aunque, principalmente en cerebro (Weissmann, 2003).

Es necesaria la presencia de la proteína PrP^c en la membrana plasmática, determinada por su ancla de GPI y su reincorporación a la célula, para su conversión a formas patológicas, PrP^{sc} (Taraboulos, 1995).

1.8.5.2 Participación de GPI en señales intracelulares

En los últimos años numerosas evidencias experimentales han asignado otra función al GPI: su participación en sistemas de señales intracelulares en respuesta a distintas hormonas y factores de crecimiento.

Como se ha señalado, la hidrólisis de GPI por una PLC libera inositolfosfoglicano (IPG). Todos los IPG estudiados hasta el presente poseen una estructura conservada que consiste en Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4glcNH₂ α 1-6*myo*-inositol-fosfato cíclico.

IPG ha sido propuesto como mediador de la acción de diferentes hormonas y factores de crecimiento como insulina (Romero, 1990; Misek, 1992; Vila, 1990; Vila, 1991) interleuquina-2 (Merida, 1990), factor de crecimiento nervioso (Represa, 1991), hormona estimuladora de tiroides (Martiny, 1990), factor de crecimiento similar a insulina de tipo I, IGF-1 (Leon, 1995) y TGF β (Bogdanowicz, 2000).

1. 8. 5. 3 Participación de GPI en la respuesta de insulina.

Se ha descrito un segundo mensajero de insulina que parece ser muy similar a los IPGs presentes en anclas de proteínas (Saltiel, 1994). En concordancia, se ha informado que anticuerpos dirigidos contra el IPG, proveniente de la glicoproteína variante de superficie de *Trypanosomabrucei*, VSG, bloquean la estimulación inducida por insulina de la piruvato deshidrogenasa en miocitos BC3H-1 (Romero, 1990). También se ha visto que el IPG obtenido del ancla de la acetilcolinesterasa (Deeg, 1993), así como el IPG aislado de levaduras (Frick, 1998) mimifica distintas respuestas de insulina. En trabajos previos del laboratorio, se informó que IPG media la activación por insulina de glicerol-3-fosfato aciltransferasa (Vila,1990), estos resultados fueron confirmados por Muller y colab. (Muller, 1997).

Además, insulina estimula la liberación al medio extracelular de enzimas ancladas por GPI por activación de una PLC (Movahedi, 1997). La activación de esta GPI-PLC por insulina esta mediada por proteína G, inhibible por toxina de pertussis que sería una Gi (Luttrell, 1988; Vila,1990).

Se ha descrito una GPI-PLD que hidroliza GPI liberando IG y se ha propuesto que IG podría mediar efectos de insulina (Jones, 1997). También, el IG proveniente de los GPI de trypanosomas, leishmania y plasmodium, parece mediar el aumento en la fosforilación en tirosina que se produce en los macrófagos durante estos procesos infecciosos (Tachado, 1997). Por otro lado, IPG como insulina, aumentaría la fosforilación en tirosina de sustratos de la actividad de tirosina quinasa del receptor de insulina como IRS-1, IRS-3 y en menor grado IRS-2 (Frick, 1998). Es decir que IPG y/o IG podrían participar en esta respuesta de la hormona.

Se ha visto que en animales diabéticos por administración de estreptozotocina esta disminuido el contenido de GPI y esta disminución puede revertirse por tratamiento con insulina (Sanchez-Arias, 1992), lo que sugiere que insulina podría estimular la síntesis de GPI.

1.8.5.4 Participación de GPI en la respuesta de ACTH

La existencia de anclas de GPI en adrenal y su regulación por factores presentes en suero fue informada por primera vez por Igarashi y Chambaz (Igarashi, 1987).

Se ha visto que ACTH es capaz de hidrolizar GPI en células de corteza adrenal bovina (Cozza, 1988)

El lipopeptidofosfoglicano (LPPG) de *Trypanosoma cruzi* es una glicoinositolfosfoceramida cuya estructura fue descrita por el grupo de la Dra. Lederkremer (Lederkremer, 1990; Lederkremer, 1991) y pertenece a la familia de los GPI. Por hidrólisis del LPPG con una PLC se libera ceramida e IPG y con una fosfolipasa D ceramida fosfato e IG.

Resultados previos del laboratorio muestran que ACTH estimula la liberación de ceramida a partir de LPPG, lo que indica activación de una PLC de GPI por la hormona lo que produciría IPG. Además, se vio que un IPG purificado de *Trypanosoma cruzi* es capaz de inhibir la respuesta de ACTH (Vila, 1995; Vaena de Avalos, 1998).

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

En el presente trabajo se desea investigar:

1- Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides en corteza adrenal.

Dado que en la síntesis de esteroides participan distintos citocromos, que son hemoproteínas, es posible que exista una relación entre la síntesis de esteroides y la de hemo.

Con el fin de analizar esta posibilidad, se estudiará en adrenales de rata:

- El efecto de la adición de hemina *in vitro* a homogenatos de adrenal y el efecto de la administración de hemina a ratas *in vivo*, sobre la síntesis de esteroides.
- El efecto de DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina, sobre la síntesis de hemo en adrenal de rata, pues se sabe que este compuesto inhibe la síntesis de hemo en hígado. Si este compuesto también es capaz de inhibir la síntesis de hemo en adrenal, se analizará su efecto sobre la síntesis de esteroides en rata.
- El efecto de un conocido inductor de la síntesis de hemo, el fenobarbital, que estimula la enzima reguladora de esta síntesis, el ALA-sintasa, sobre la síntesis de esteroides.
- El efecto de estimuladores de la síntesis de esteroides en adrenal como ACTH y endotelina sobre la enzima ALA-sintasa.

2- Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata.

Se ha visto que ACTH es capaz de estimular una fosfolipasa C que hidroliza glicosilfosfatidilinositol (GPI) lo que libera inositolfosfoglicano (IPG) y que IPG es capaz de inhibir la acumulación de esteroides mediada por ACTH. Además, ACTH estimula la liberación al medio extracelular de fosfatasa alcalina, una enzima anclada a la superficie celular por GPI.

Por ello, se quiso investigar:

- Si la liberación de fosfatasa alcalina por ACTH está mediada por una fosfolipasa C que hidroliza GPI.
- El mecanismo involucrado en la activación de la fosfolipasa C de GPI por ACTH.

METODOS

CAPITULO 2. METODOS

2.1. Estudios “*in vivo*” con ratas

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley que fueron criadas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA o en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME).

2.1.1. Tratamiento de las ratas por inyección.

2.1.1.1 Tratamiento de las ratas con DDC.

Ratas machos Sprague-Dawley (230 a 270 g de peso) se inyectaron intraperitonealmente con DDC suspendido en aceite de maíz, utilizando una dosis de 300 mg/kg. A los animales controles se les inyectó aceite de maíz solamente. Después de 5 hs, se mataron los animales por decapitación. Se extrajeron las adrenales, se les quitó la grasa y el tejido conectivo y se prepararon los homogenatos. También se extrajeron los hígados, se cortaron en trozos pequeños y se prepararon los homogenatos. Los homogenatos de adrenal y de hígado se utilizaron en la medición de la actividad de dos enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo: ALA-s y ferroquelatasa y en la medición del contenido de porfirinas.

Por otro lado, en otra serie de experimentos en los que se analizó el contenido de esteroides en adrenal, se sometieron los animales primero a tratamiento con vehículo o con DDC y a continuación se infundieron con ACTH o hemina, como se explica más adelante (Sección 2.1.2.1)

2.1.1.2 Tratamiento de las ratas con fenobarbital.

Se trataron ratas machos Sprague-Dawley de 230 a 270 g de peso con distintas dosis de fenobarbital, por distintos tiempos y utilizando distintas formas de administración de la droga.

Por un lado, se administró fenobarbital por inyección intraperitoneal. Se analizó el efecto de: a) una inyección intraperitoneal de 80 mg de fenobarbital/kg de peso en 1 ml de solución fisiológica por 24 horas, b) una inyección intraperitoneal de 100 mg de fenobarbital /kg de peso en 1 ml de solución fisiológica por 18 ó 24 hs, c) dos dosis intraperitoneales de 60 mg de fenobarbital/kg administradas 48 y 24 hs antes de finalizado el tratamiento.

Por otro lado, se administró el fenobarbital en el agua de bebida (1 g de fenobarbital suspendido en 2 ml de NaOH 2 N, calentado luego a 40 °C hasta disolución total y llevando finalmente a 1l con agua corriente de red) durante distintos tiempos: 18 hs, 1, 2, 5, 7 ó 10 días.

Después del tratamiento se mataron los animales por decapitación. Se extrajeron los hígados y las adrenales, a estas últimas se les quitó la grasa y el tejido conectivo. Se prepararon los homogenatos y se midió la actividad de ALA-s.

En las ratas tratadas con dos dosis de fenobarbital de 60 mg/kg, administradas 48 y 24 hs antes de matar a los animales, también se midió el contenido de aldosterona y corticosterona en adrenal. Para ello, se prepararon homogenatos de adrenal y se centrifugaron a 6.000 x g durante 20 min. Después de la centrifugación, se separaron los sobrenadantes y se midieron aldosterona y corticosterona por radioinmunoensayo (RIA), como se detalla más adelante (Sección 2.9.3.1).

2.1.1.3 Tratamiento de las ratas con ACTH para Northern-blot.

Se inyectaron intraperitonealmente ratas machos Sprague-Dawley de 280 a 300 g de peso con una mezcla de 5 UI de Acthelea Corticotropina (Elea) de acción rápida y 4 UI de Acthelea Gel (Elea) Corticotropina de acción retardada, 48 y 24 hs antes de matar a los animales. Se extrajeron las adrenales, para la obtención de RNA o la cuantificación de esteroides.

2.1.2 Tratamiento de las ratas por infusión.

Se anestesiaron ratas machos Sprague-Dawley de 280 a 300 g de peso con tiopental sódico (60 mg/kg). Una vez dormidas, se procedió a realizarles una

traqueotomía por colocación de una cánula traqueal, con el fin de eliminar las secreciones producidas durante el período de anestesia que pudieran obstruir las vías respiratorias. A continuación se localizó la vena yugular y se la canuló para realizar las distintas infusiones, utilizando un flujo de 0,125 ml de solución/minuto. Los animales permanecieron anestesiados durante el tiempo que duró la infusión.

2.1.2.1 Infusión de ACTH y/o hemina

Después de un período de estabilización de 15 min, se infundió solución fisiológica por 15 min, luego solución fisiológica o hemina (67 mg/kg x min) por 30 min. y finalmente solución fisiológica o ACTH (100 ng/kg x min) por 30 min. más. Al final de las infusiones, se mataron las ratas, se extrajeron las adrenales y se les quitó la grasa y el tejido conectivo. Se prepararon homogenatos y se centrifugaron a 6.000 x g durante 20 min. Después de la centrifugación, se separaron los sobrenadantes y se midieron aldosterona y corticosterona por RIA.

2.1.2.2 Infusión de ACTH o endotelina.

Después de un período de estabilización de 15 min, se infundió solución fisiológica por 15 min, luego ACTH (100 ng/kg x min), endotelina (80 ng/kg x min) o solución fisiológica por 60 min más. Al final de las infusiones, se mataron las ratas y se extrajeron las adrenales para la obtención de RNA o la cuantificación de esteroides.

2.2 Estudios en células adrenocorticales de rata. Preparación de células

Se extrajeron las adrenales de ratas machos Sprague-Dawley (180-200 g), se les quitó la grasa y se separaron en cápsula (predominantemente glomerulosa) y core (fasciculata/reticularis y médula). Se resuspendieron cápsula y core en 10 ml de medio Ham F-12 suplementado con CaCl_2 1,58 mM (Ham F-12/ Ca^{2+}) conteniendo colagenasa 1 mg/ml, desoxirribonucleasa 0,4 mg/ml y seroalbúmina bovina 0,5%. Se incubaron las preparaciones a 37°C, con agitación constante durante 45 ó 50 min dependiendo de la

fracción (core ó cápsula, respectivamente). Después de 10 y 20 min. de iniciada la incubación, la suspensión fue aspirada varias veces en forma mecánica con una jeringa plástica de 25 ml, para disgregar el tejido. Finalizada la incubación, se filtró la suspensión celular a través de doble gasa, descartando los restos de tejido no disgregados que quedaron retenidos en la malla. Las células fueron recogidas del filtrado por centrifugación a 900 g x 10 min. Luego se lavó el precipitado de células dos veces con 10 ml de Ham F-12/Ca²⁺ al que se le agregó 0,5 % de seroalbúmina bovina y finalmente se resuspendió en este medio. Se utilizó una alícuota de esta suspensión para el recuento de células viables, el cual fue realizado en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico con un aumento de 400X. La viabilidad de las células se determinó mediante la técnica de exclusión del colorante Azul Tripán (0.1 ml de Azul Tripán 0,4 % p/v en 0.1 ml de suspensión celular). Se consideraron células viables aquellas que no presentaban tinción alguna.

La preparación celular se incubó durante 45 minutos a 37°C con agitación, bajo una atmósfera de 95 % O₂ / 5 % CO₂, con el fin de que las células se recuperen del stress producido durante el tratamiento con la colagenasa. Luego, la preparación se centrifugó a 900 x g durante 10 minutos; el precipitado de células obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de medio de incubación (Ham F-12/Ca²⁺ al que se le agregó 0,5 % de seroalbúmina bovina), de modo de obtener el número de células viables deseadas por ml, para ser utilizado en los diferentes estudios.

2.3 Determinación de la producción de aldosterona y corticosterona en suspensiones de células adrenocorticales.

Las células adrenocorticales se resuspendieron a razón de 40.000 células por tubo. Cada tratamiento se efectuó por duplicado en un volumen final de 0.2 ml de medio de incubación.

Se incubaron los tubos durante 60 minutos en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante. Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 6.000 x g durante 20 minutos. Con esta velocidad de centrifugación se asegura la ruptura de las células y la liberación al medio de los esteroides. Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -20°C hasta su utilización para la determinación de los esteroides por RIA.

2.4 Determinación de la producción de aldosterona y corticosterona en homogenatos de adrenal en presencia de hemina.

Se mataron ratas machos Sprague-Dawley por decapitación, se extrajeron las adrenales y se homogeneizaron en Tris-HCL 20 mM, sacarosa 25 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄·7 H₂O 0,5 mM y glucosa 1 g/l (pH 7,4). Los homogenatos se trataron con DOC 30 µM en baño de hielo por 20 min., luego se agregaron diferentes concentraciones de hemina o vehículo para los controles. La hemina se disolvió en NaOH 0.1 N y se neutralizó con HCL 0,1 N; se hizo una preparación igual pero sin hemina para ser utilizada como vehículo. La disolución de la hemina se realizó en oscuridad para minimizar la oxidación fotoquímica.

Luego del tratamiento con hemina o vehículo la reacción se comenzó por el agregado de 50 µl de NADPH 5 mM en un volumen total de incubación de 0,5 ml. Después de una hora de incubación las muestras se centrifugaron a 7.000 x g por 30 min. y se midieron aldosterona y corticosterona por RIA en los sobrenadantes obtenidos.

2.5. Determinación de la actividad de ALA-s

Se midió la actividad de ALA-s en los homogenatos de hígado o de adrenal de acuerdo al método de Marver (Marver, 1966).

Para la preparación de los homogenatos de hígado se homogeneizó 1 g de hígado en buffer de homogeneización (buffer Tris HCL 10mM pH:7,4 conteniendo NaCL 0,9% y EDTA 0,5 mM) de modo de obtener 3ml de homogenato. Para la preparación de los homogenatos de adrenal, se pesó el par de adrenales provenientes de cada una de las ratas y el de menor peso se homogeneizó en 1,1 ml de buffer. Las demás adrenales se homogeneizaron manteniendo la misma relación de gramos de adrenal por ml de homogenato.

Se realizaron luego las incubaciones indicadas en el siguiente cuadro:

	Homogenato	Glicina 0,4 M	EDTA 0,1M	Buffer Tris 0,2 M	Incubación	TCA 25 %
Hígado						
Ensayo	0,5 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,8 ml	37 °C 1h	0,5 ml
Blanco	0,5 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,8 ml	no	0,5 ml
Adrenal						
Ensayo	0,25 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,4 ml	37 °C 1h	0,25 ml
Blanco	0,25 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,4 ml	no	0,25 ml

Se incubó a 37 °C con agitación durante 1 hora. Se terminó la incubación con el agregado de ácido tricloroacético (TCA) y se dejó en heladera hasta el día siguiente. Luego se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se agregaron 3 ó 4 gotas con pipeta capilar de NaOH 5N para obtener un pH de aproximadamente 4,6. Se pipeteó luego 1 ml de esta solución en tubos a rosca, se agregó 1 ml de buffer acetato 0,1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona. Se calentó en agua hirviendo durante 10 minutos para formar el pirrol correspondiente y se agregó a cada tubo 2 ml de reactivo de Erlich preparado como se indica más abajo. Se leyó la absorbancia a 555 nm. El cálculo de actividad se realizó de la siguiente forma:

Para hígado:

$$\text{pmol ALA/ mg de tejido por h} = \frac{(A_{\text{Ensayo}} - A_{\text{Blanco}}) \times 2,5 \times 2 \times 3 \times 10^6}{6,1 \times 10^4 \times 0,5}$$

Siendo:

2,5: vol final de incubación en ml

2 : factor de dilución de la colorimetría.

3: relación en homogenato (1g hígado a 3 ml)

10^6 : factor de conversión de unidades

$6,1 \times 10^4$: E_M

0,5: vol alícuota de homog. en ml

Para adrenal:

$$\text{pmol ALA/ mg de tejido por h} = \frac{(A_{\text{Ensayo}} - A_{\text{Blanco}}) \times 1,25 \times 2 \times 1,1 \times 10^6}{6,1 \times 10^4 \times 0,25 \times \text{mg adrenal}}$$

Siendo:

1,25: vol final en ml

2 : factor de dilución.

1.1: volumen final de homogenato

10^6 : factor de conversión de unidades

$6,1 \times 10^4$: E_M

0,25: vol alícuota de homogenato en ml

Preparación del reactivo de Erlich: Se pesa 1 g de p-dimetilaminobenzaldeído y se agregan 30 ml de ácido acético glacial y 8 ml de ácido perclórico 70 %. Finalmente se completa a 50 ml con ácido acético glacial.

2.6 Determinación de la actividad de ferroquelatasa

Se midió la actividad de ferroquelatasa en mitocondrias de glándula adrenal y de hígado por el método de Cole et al. (Cole, 1984). Se prepararon los homogenatos en sacarosa 0,25 M, pH 7. Para la preparación de los homogenatos de adrenal se juntaron las adrenales de tres ratas y para la preparación del homogenato de hígado se tomó 1,5 g del hígado de cada una de las tres ratas.

Se realizó un fraccionamiento subcelular de los homogenatos para obtener el precipitado de 12.000 x g de mitocondrias. El fraccionamiento subcelular consistió en realizar una primera centrifugación a 900 x g durante 5 minutos y luego de descartar el precipitado, el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 12.000 x g durante 20 minutos, obteniéndose un precipitado de 12.000 x g correspondiente a la fracción de mitocondrias de hígado o de adrenal.

El precipitado de 12.000 x g de hígado se resuspendió en 2 ml de buffer Tris HCl 50 mM pH 8,2 y el precipitado de 12.000 x g de adrenal en 1 ml del mismo buffer y se determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Se realizaron luego las incubaciones indicadas en el siguiente cuadro, durante 1 hora, a 37 °C, aeróbicamente y en oscuridad.

	Mitocondrias + Buffer	Proteínas por ensayo	Buffer Tris 50 mM	Mesoporfirina 2µmoles/ml	Succinato 0,15 M	CoCl ₂ 10-3 M
Hígado						
Ensayo	0,3 ml	10 mg	2,5 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml
Blanco	0,3 ml	10 mg	2,6 ml	—	0,2 ml	0,2 ml
Adrenal						
Ensayo	0,3 ml	1mg	2,5 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml
Blanco	0,3 ml	1mg	2,6 ml	—	0,2 ml	0,2 ml

Finalizada la incubación, se colocaron los tubos inmediatamente en hielo y se volcó cada tubo en otro que contenía 1 ml de piridina y 0,5 ml de NaOH 1 N. Se dejaron 20 minutos, y luego se agregó 1 ml de agua y se determinó espectrofotométricamente la cantidad de piridin-hemocromógeno formado. Para ello, se dividió el contenido del tubo en dos cubetas, a una de ellas se le agregó ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) aproximadamente 2 mg (una punta de espátula) y a la otra 0,05 ml de ferricianuro de potasio $[\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_3]$ 3×10^{-2} M. Se leyó la absorbancia a 535 y 551 nm y se calculó la diferencia de absorbancia, $\Delta A = A_{551} - A_{535}$, tanto para el ensayo como para el blanco correspondiente. El cálculo de actividad se realizó de la siguiente forma:

$$\text{nmol MESO/ mg de prot. x h} = \frac{(\Delta A_{\text{Ensayo}} - \Delta A_{\text{Blanco}}) \times 1.000 \times v}{12,5 \times \text{mg prot. incubados}}$$

Siendo:

v: vol en ml de la solución alcalina de piridina.

1.000: factor de conversión de unidades ($\mu\text{moles/ml}$ a nmoles/ml)

12,5: E_{551} (mM) - E_{535} (mM)

Dosaje de mesoporfirina: Se disuelven unos miligramos de mesoporfirina en 1 ml de amoníaco 2 N. La solución se diluye en 5 ml de agua destilada y se lleva a pH 8,2 con HCl 1 N. Luego se agrega buffer Tris HCl pH 8,2 de modo de obtener una concentración final de buffer de 0,01M y finalmente 0,2 volúmenes de Tween 80, 1 % p/v.

Para el dosaje se hace una dilución (aproximadamente 1/1.000) en HCl 0,1 N y se mide la absorbancia a 399 nm. El cálculo de la concentración de mesoporfirina se hizo sabiendo que el ϵ mM es de 445. Una vez determinada la concentración se hizo la dilución apropiada para obtener 2 μmoles de mesoporfirina/ml.

2.7 Determinación del contenido de porfirinas

Se homogeneizaron 50 mg de adrenales en 1 ml de KCL 0,154 M y 1 g de hígado en 3 ml KCL 0,154 M. Luego se agregaron 110 μ l de HCL concentrado por cada ml de homogenato (lo que da una concentración final de HCL de 5 % p/v), ya sea de adrenal o de hígado y el precipitado formado se separó por filtración. El precipitado remanente en el papel de filtro se lavó con 3 ml de HCL 5%. Se determinó el contenido de porfirinas en los filtrados de los homogenatos de HCl al 5 % por fluorometría usando una λ de excitación de 405 nm y una λ de emisión de 635 nm según se ha informado para la cuantificación de protoporfirina (Brenner, 1980). Se utilizó un espectrofotofluorómetro gentilmente facilitado por el Departamento de Fisico-Química de la FCEyN,UBA. El contenido de porfirinas se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia por 100 mg de tejido.

2.8 Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína standard.

2.9 Cuantificación de los esteroides por radioinmunoensayo.

Los esteroides aldosterona y corticosterona se cuantificaron utilizando radioinmunoensayo (RIA), técnica que se describe a continuación.

El protocolo general consistió en pipetear: 10 μ l del esteroide a cuantificar (estándar o muestra incógnita), el esteroide radioactivo o marcador (5.000 dpm por ensayo aproximadamente) y el anticuerpo específico del esteroide a cuantificar, en un volumen final de 0,2 ml de buffer borato de sodio 0,1 M pH: 8 conteniendo 0,1 % de la fracción V de seroalbúmina bovina y 0.2 % de γ -globulina. En paralelo se incubó el [³H]-esteroide marcador en ausencia de anticuerpo y de esteroide radioinerte.

Los ensayos se dejaron entre 16 y 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo, la incubación se interrumpió por el agregado de 0.5 ml de una solución a 4 °C de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75% de saturación. Luego se centrifugaron los tubos a 6.000 x g durante 20 minutos en centrífuga refrigerada. Los tubos preparados sin anticuerpo y sin esteroide radioinerte se dividieron en dos grupos, uno no se centrifugó y permitió calcular las cuentas totales por ensayo y el otro se centrifugó y permitió calcular la unión inespecífica.

Los sobrenadantes obtenidos, que contienen el esteroide no unido al anticuerpo, se volcaron a viales para contar la radioactividad presente en cada muestra. Para ello, se agregó a los viales 1 ml de solución centelleadora Optiphase Hi Safe III de Walac (Tor Ku - Finlandia), y se agitó vigorosamente. Finalmente, se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido beta.

La determinación cuantitativa se realizó por medio de una curva de calibración que se hizo utilizando cantidades crecientes de estándares del esteroide a cuantificar. La preparación de los estándares se realizó a través de diferentes diluciones de una solución madre en buffer borato de sodio 0.1 M de pH: 8, conteniendo 5% de etanol.

A partir de la diferencia entre el valor de cpm de esteroide libre obtenido para cada masa de standard y las cpm de esteroide libre del tubo correspondiente a pérdidas inespecíficas, se calculó el valor de cpm de esteroide unido al anticuerpo para cada standard.

A continuación, se graficó el cociente entre las cpm de esteroide unido al anticuerpo obtenidos con cada standard y las cpm de esteroide unido al anticuerpo en el tubo sin agregado de masa de standard en función del logaritmo de la masa de standard. Utilizando esta curva de calibración, cada uno de los valores de esteroide unido obtenidos en las muestras fue convertido a masa de esteroide presente en la misma.

La cantidad del anticuerpo anti-esteroide a ser agregada en cada ensayo, se predeterminó en base al título del mismo. Se utilizó la concentración de anticuerpo que produjo un 50 % de unión específica. Para la determinación de dicha concentración se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo, las cuales se incubaron como se describió anteriormente con una cantidad fija de $[^3\text{H}]$ -esteroide como trazador. Luego del ensayo se determinó la radioactividad asociada al complejo trazador-anticuerpo y se graficaron curvas de % de trazador unido en función de la dilución del anticuerpo y

con ello se obtuvo la concentración de anticuerpo que une el 50 % del trazador adicionado para cada caso.

2.9.1. RIA de aldosterona

La curva de calibración abarcó un rango entre 0 y 100 pg de aldosterona. El marcador [1,2-³H(n)]-aldosterona tiene una actividad específica de 52 Ci/mmol. Se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de un hibridoma de ratón (Gomez-Sanchez C., 1987), siendo el título de 1/7.000.

2.9.2. RIA de corticosterona

La curva de calibración abarcó un rango entre 0 y 1000 pg de corticosterona. El marcador [1,2-³H(n)]-corticosterona tenía una actividad específica: 50-60 Ci/mmol. Se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido de suero de oveja (Gomez-Sanchez C., 1975), siendo el título de 1/4.000.

2.9.3. Preparación de las muestras para las cuantificaciones por RIA

2.9.3.1 Determinación de concentraciones de esteroides en adrenal

Después de extraer las adrenales, se les quitó la grasa y el tejido conectivo y se prepararon los homogenatos en buffer de homogeneización (Tris-HCL 20 mM pH 7,4; sacarosa 25 mM; CaCl₂ 3 mM; MgSO₄·7 H₂O 0,5 mM y glucosa 1 g/l). Se pesó el par de adrenales de las distintas ratas y el de menor peso se homogeneizó en 1 ml de buffer. Las demás adrenales se homogeneizaron manteniendo la misma relación de gramos de adrenal por ml de homogenato. Luego se centrifugó a 6.000 x g durante 20 minutos y se separaron los sobrenadantes que se congelaron a -20 °C hasta su utilización para la determinación de los esteroides por RIA.

2.9.3.2 Determinación de la concentración de esteroides en las incubaciones con células dispersas

En los ensayos en los que se utilizaron células adrenocorticales, una vez finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 6.000 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -20 °C hasta su utilización para la determinación de los esteroides por RIA.

2.9.3.3 Determinación de los niveles séricos de corticosterona

Las muestras de sangre obtenidas por punción ocular se incubaron 2 hs a 37 °C para la separación del suero. Luego las muestras se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos y se separaron los sobrenadantes como fracción sérica.

En la determinación de los niveles séricos de corticosterona el mayor inconveniente radica en la existencia de una fracción de la proteína ligadora de corticosteroides (CBG) que une en el RIA al trazador subestimando la concentración del esteroide. Para evitar esto, las muestras deben ser sometidas a un tratamiento para inactivar o remover esta proteína. En este trabajo se utilizó un método de desnaturalización de la CBG mediante tratamiento con solventes (Gomez-Sanchez, 1975). Con este fin, una alícuota de 10 µl de la muestra o estándares se desnaturalizaron por el agregado de 0,1 ml de metanol. El solvente se evaporó durante toda la noche a temperatura ambiente y se procedió a la realización del RIA de estos tubos.

2.10 Cuantificación de mRNA

2.10.1 Aislamiento de RNA

Se extrajo el RNA total a partir de adrenal o hígado de rata utilizando el reactivo de fenol/tiocianato de guanidina (TRIzol reagent, Life Technologies, Inc.). El método se

basa en el uso de una solución 14 M de tiocianato de guanidinio y urea como agentes desnaturalizantes. La cantidad de RNA extraída fue cuantificada por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm.

2.10.2 Cuantificación del mRNA de ALA-s por Northern-blot.

Para cuantificar el mRNA de ALA-s, se utilizó una sonda marcada, que se construyó a partir de un plásmido que contiene el cDNA de ALA-s de hígado de rata, gentilmente provisto por el Dr. M. Yamamoto.

Se transformaron bacterias competentes de *E. coli* en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina con el plásmido conteniendo el cDNA de ALA-s y el gen de resistencia al antibiótico. Se extrajo el DNA plasmídico del clon de *E. coli* seleccionado utilizando el Genie Prep DNA Isolation Kit de Ambion, basado en lisis celular alcalina y purificación del DNA por absorción a fibra de vidrio. El plásmido obtenido se verificó por mapeo de restricción. Para ello se incubaron 20 µl DNA plasmídico con 2 U de EcoRI durante 60 min a 37 °C y luego fueron analizados en un gel de agarosa 1,2 %, confirmándose la liberación del inserto de 1972 pb.

Para la obtención de la sonda se purificó el plásmido en forma similar a lo antes mencionado y el inserto se purificó por corrida en gel de agarosa de bajo punto de fusión y extracción de ésta utilizando las columnas del kit Genie Prep DNA Isolation Kit de Ambion. Después de cuantificar la cantidad de inserto obtenida (por comparación de las bandas del gel con las de estándares de DNA de masa conocida) se realizó la marcación de la sonda de ALA-s con (α 32 P) dCTP mediante la técnica de marcado al azar ('random primer labeling') utilizando el DECAprime IITM DNA labeling Kit de Ambion, basado en el uso de decámeros al azar y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa carente de actividad exonucleasa, según el protocolo provisto por el fabricante.

Una vez preparada la sonda para cuantificar el mRNA de ALA-s, se aisló el RNA total de las adrenales de rata y 30 µg de RNA fueron tratados con glioxal-DMSO y separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %. Luego se transfirió el RNA a una membrana de nylon Zeta-Probe (BioRad) mediante transferencia capilar alcalina

ascendente (Chomczynski, 1992) y se fijó mediante horneado a 80 °C durante 30 minutos.

La membrana se observó en un transiluminador, donde se determinó la posición de las bandas de los RNA ribosomales de 28S y 18S. Se dejó hibridizando con la sonda marcada a 50 °C durante toda la noche utilizando el Northern Max-Gly™ Kit de Ambion. Luego se lavó la membrana dos veces con buffer de baja rigurosidad a temperatura ambiente durante 5 minutos y dos veces con buffer de alta rigurosidad a la misma temperatura que la hibridización durante 15 minutos.

Finalmente utilizando una placa fotográfica KODAK X-OMAT se expusieron las membranas por distintos períodos de tiempo y se revelaron las autorradiografías como se indica más adelante (Sección 2.13).

2.10.3. Cuantificación del mRNA de ALA-s por ensayo de protección a ribonucleasa (RPA).

La sonda de RNA antisentido se construyó a partir del plásmido que contiene el cDNA de hígado de rata provisto generosamente por M. Yamamoto (Yamamoto M., 1988) utilizando PCR. Con el fin de preparar la sonda biotinilada para el mRNA de ALA-s se diseñaron primers de PCR utilizando el programa Gene Jockey de modo de obtener un producto de PCR de aproximadamente 400 pb. Se agregó la secuencia del promotor del fago T7 en el extremo 5' del primer antisentido. El fragmento de DNA presente en el plásmido que contiene el gen de ALA-s hepática, se amplificó por PCR utilizando estos primers. Después de aislar y purificar el fragmento de DNA producto de la PCR que contiene el promotor de T7 río arriba del gen de interés, se utilizó este DNA como templado en un ensayo de transcripción *in vitro* en presencia de T7 polimerasa y una mezcla de nucleótidos incluyendo CTP-14-biotina, utilizando el kit "BIOTINscrip non-isotopic in vitro transcription" (AMBION Inc, Austin, TX). De este modo se generó un RNA antisentido biotinilado de 413 nucleótidos. Después de la reacción se trató la muestra con DNasa libre de RNasa y la sonda de RNA biotinilada se purificó en un gel de poliacrilamida 5% conteniendo urea 8M. La banda fue ubicada en el gel usando luz UV de 254 nm y fue cortada y eluida.

Una vez preparada la sonda biotinilada de RNA antisentido para ALA-s, se realizó el ensayo de protección a ribonucleasas usando el kit RPA III (Ambion Inc., Austin, TX).

Diez microgramos de RNA total se hibridizaron durante toda la noche a 65 °C con la sonda biotinilada y luego, el RNA no protegido se digirió con RNAsas y el RNA protegido se precipitó y se aisló usando un gel de poliacrilamida al 5 % conteniendo urea 8 M. El RNA aislado se transfirió a una membrana de nylon Zeta-probe (BioRad) y se detectó usando el kit BrightStar Biodetect (Ambion).

2.10.4. Cuantificación del mRNA de Cyp21 por ensayo de protección a ribonucleasa (RPA).

También se preparó una sonda biotinilada para el mRNA de CYP-21. Con este fin un plásmido que contiene el gen de esta proteína de adrenal de rata bajo el control del promotor de T7, se linealizó con una enzima de restricción apropiada (Xba1) de modo de obtener por transcripción in vitro un RNA antisentido de tamaño apropiado para ensayos de RPA como se describió anteriormente (Zhou, 1997).

2.11 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Se incubaron células (6×10^4 células en 0,15 ml) preparadas como se describió anteriormente (Sección 2.2) por 7 min. con los tratamientos indicados en cada caso. Después de la incubación las suspensiones celulares se centrifugaron (900 g x 10 min) y se usaron los sobrenadantes para medir la actividad de fosfatasa alcalina. Una alícuota del sobrenadante se incubó por 15 min a 37 °C en un volumen final de 1 ml de la mezcla de reacción que contiene: buffer carbonato 0,1M (pH:10), $MgCl_2$ 1 mM, p-nitrofenilfosfato 2 mg/ml. La reacción se paró por el agregado de 2 ml de NaOH 0,1 M. El producto de la reacción, p-nitrofenol, se determinó espectrofotométricamente a 410 nm. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un incremento de 1 en la absorbancia bajo estas condiciones de ensayo.

2.12 Separación de FAL libre y anclada con Tritón X-114

La partición con Tritón X-114 de la fosfatasa alcalina liberada al medio extracelular se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las muestras se tomaron en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM pH: 7.4, NaCl 150 mM), se mantuvieron a 0°C y se agregó Tritón X-114 a partir de una solución precondensada 12%, preparada según se ha descrito (Bordier, 1981), para alcanzar una concentración final de 2%. La preparación se incubó a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó obteniéndose dos fases: una acuosa (superior) y otra detergente (inferior) enriquecida en proteínas ancladas por GPI.

Se determinó la actividad de FAL en las dos fracciones de Tritón X-114. En el caso de la fracción detergente se agregó 0.2% de Tritón X-100 en los ensayos.

2.13 Detección de Gi por Western-blot en células adrenocorticales

Se prepararon células adrenocorticales como se describió anteriormente (Sección 2.2). Las células se homogeneizaron y después de centrifugar a 500xg durante 5 min, se obtuvo el sobrenadante para la electroforesis. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1979). Una alícuota del sobrenadante (30 µg/línea) se diluyó en buffer de siembra y se corrió en un gel de poliacrilamida al 10 %, a 120 V durante 1 h. La composición del gel concentrador, separador y buffer de siembra se muestra en el siguiente cuadro.

Reactivos	Gel(10%)	Gel
	Separador	Concentrador
Tris-ClH 1.5 M pH:8.8	2.5 ml	-----
Tris-ClH 0.5 M pH:6.8	-----	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
Sol. de acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%	3.3 ml	0.50 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.1 ml	0.05 ml
H ₂ O destilada.	4.0 ml	3.15 ml
--- mezclar suavemente ---		
TEMED	0.003 ml	0.003 ml

Reactivos	Buffer de Siembra (5X)
Tris-ClH 0.5 M pH:6.8	4.0 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	0.5 ml
Azul de Bromofenol 0.1 %	0.5 ml
β-mercaptoetanol	0.1 ml

Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó la transferencia semiseca con aparato Trans-Blot SD de BIO-RAD, a membrana de nitrocelulosa (poro: 0,2 μ m, Sigma N-8017) previamente humedecida en el buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% v/v pH: 8,3). Se colocó la membrana en contacto directo con el gel, entre hojas humedecidas de papel Whatman 3MM, en un campo eléctrico (12 V) durante 30 minutos. La eficiencia de la transferencia se evaluó tñiendo la membrana con una solución de rojo Ponceau S 0,2 % en ácido acético 1 % durante 2 minutos y luego destñiendo varias veces con agua destilada, así como por la transferencia de estandares coloreados de peso molecular aparente entre 10 y 200 kDa. (BenchMark™ Prestained Protein Ladder de Life Technologies, GibcoBRL).

Finalizada la transferencia, la membrana que contenía la muestra, se reveló con el anticuerpo anti-Gi.

Con este fin, primero, se efectuó el bloqueo de las membranas de nitrocelulosa por tratamiento con buffer de Bloqueo Tris 25mM, NaCl 9% p/v, pH: 8 (TBS), BSA 3% durante toda la noche y al día siguiente, se realizó la detección inmunológica indirecta.

Las membranas se lavaron con buffer de lavado TTBS (TBS, Tween 20 0,05% v/v) 5 veces durante 10 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo anti-Gi en TBS, EDTA 1mM, Nonidet-40 0.05%, BSA 0.25%, durante 1 hora a 37°C. Luego, las membranas se lavaron nuevamente y se incubaron con el segundo anticuerpo disuelto en TBS, EDTA 1mM, Nonidet-40 0.05%, BSA 0.25%, durante 1 hora más a 37°C. Finalmente, después de lavar las membranas con TTBS como se indicó anteriormente se procedió al revelado utilizando un reactivo quimioluminiscente (NEM Life Science product). Como primer anticuerpo se usó el anticuerpo anti-Gi, que reconoce el dcapéptido C-terminal común de las subunidades α de Gi1 α y Gi2 α , diluído 1:1000. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo de carnero anti-conejo acoplado a peroxidasa.

Para el revelado de las bandas, se determinó la actividad de peroxidasa. Con este fin se mezclaron volúmenes iguales del reactivo 'Enhanced Luminol' (NEM™ Life Science Products) y del reactivo oxidante para tener 0,125 ml de solución por cm² de membrana. Se incubaron las membranas con este reactivo durante 1 minuto y luego de eliminar el exceso de reactivo, se colocaron las membranas bajo un plástico para exponerlas en oscuridad a una película radiográfica por un tiempo variable entre 2 minutos y 1 hora. Luego se reveló la película sumergiéndola sucesivamente durante 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en:

- 1- Solución de revelador (Metol, 2,2 g; Na₂SO₃ 72 g; hidroquinona, 8,8 g; Na₂CO₃ anh. 48 g; en 1 litro de agua destilada)
- 2- Solución de lavado (ácido acético glacial 2 % v/v).
- 3- Solución de fijador (se utilizó una dilución 1:4 del fijador comercial ultra rápido Romfix, Romek)

2.14 Efecto de anticuerpos anti-Gi sobre la liberación de fosfatasa alcalina

Se prepararon células adrenocorticales de rata como se describió anteriormente. Para su permeabilización, las células se trataron durante 5 minutos a 0 °C en medio Hank conteniendo 40 µg de digitonina/ml, como fue descrito anteriormente (Sakata, 1999). Después de este tratamiento se centrifugaron las células y se lavaron con medio de incubación para eliminar el detergente. Las células así permeabilizadas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con anticuerpos anti-Gi, con IgG de suero normal de conejo (IgG normal) o con vehículo. Luego, las células fueron estimuladas con ACTH (1 nM) o con vehículo durante 7 minutos. Finalizados los tratamientos se midió la actividad de fosfatasa alcalina.

RESULTADOS

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE HEMO SOBRE LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES EN CORTEZA ADRENAL.

3.1.1 Efecto del tratamiento con hemina sobre la síntesis de esteroides

Teniendo en cuenta, como hemos señalado anteriormente, que en la síntesis de esteroides participan hemoproteínas como los citocromos P450, quisimos realizar estudios tendientes a evaluar los requerimientos de hemo en la biosíntesis de esteroides.

Con el fin de analizar el efecto del contenido de hemo sobre la síntesis de esteroides, primero investigamos el efecto del agregado de diferentes concentraciones de hemina sobre la producción de aldosterona y corticosterona a partir de DOC en homogenatos de adrenal de rata. Aldosterona es el principal mineralocorticoide y corticosterona, el principal glucocorticoide de la rata. Se encontró una activación dependiente de la dosis de hemina de la síntesis de ambos esteroides (Figura 6).

3.1.2. Efecto del DDC sobre la síntesis de hemo en adrenal

DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina, es un conocido inhibidor de la enzima que cataliza el último paso en la biosíntesis de hemo, la ferroquelatasa. El mecanismo de acción del DDC ha sido muy estudiado en hígado, esta droga produce una rápida pérdida del citocromo P 450 debido a la conversión de su hemo en N-metil protoporfirina IX, la cual es un potente inhibidor de ferroquelatasa (De Matteis, 1988; Cole, 1984; Marks, 1988). En cambio, no se ha evaluado el efecto de DDC sobre la síntesis de hemo en adrenal aunque resultados previos indicarían que DDC es capaz de inhibir la biosíntesis de hemo en células adrenocorticales de vaca (Cozza, 1993). Por todo esto, se trataron ratas con DDC, utilizando las condiciones que se ha informado afectan la biosíntesis de hemo en hígado, 300 mg de DDC/kg de rata durante 5 hs (De Matteis, 1973) y se analizó el efecto de este tratamiento sobre la síntesis de hemo. Se extrajeron los hígados y las glándulas adrenales de ratas tratadas con DDC ó con vehículo (controles) y se midió la actividad de ferroquelatasa.

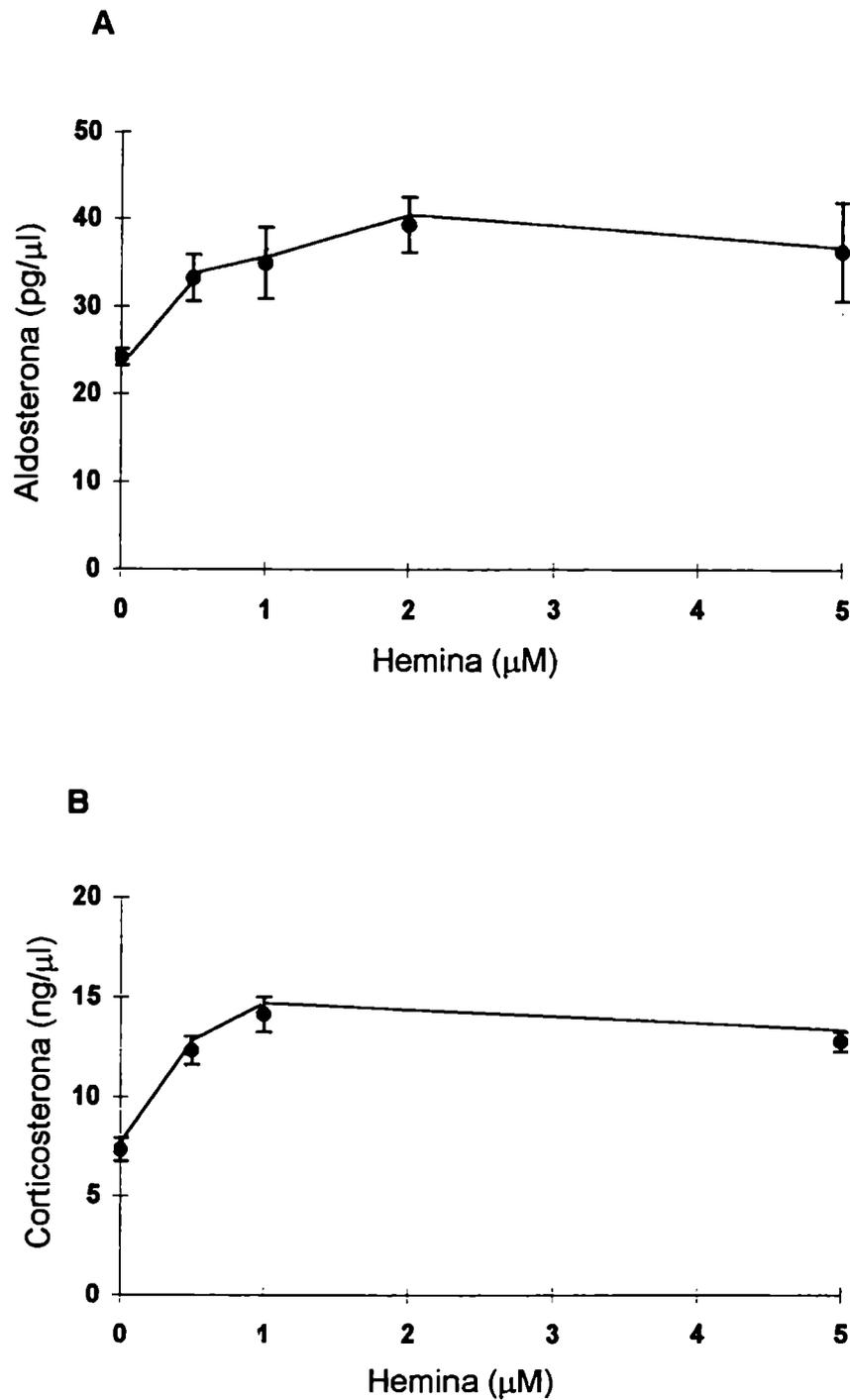


Figura 6. Efecto de hemina sobre la producción de aldosterona y corticosterona. Se incubaron homogenatos de adrenal con DOC 30 μM en presencia de concentraciones crecientes de hemina (0-5 μM) durante 60 min. Después de la incubación se midieron aldosterona (A) y corticosterona (B) por RIA en el sobrenadante de 6000 x g por 30 min. Los resultados expresan el promedio \pm E. S. de duplicados y son representativos de 3 experimentos. Todos los tratamientos con hemina son significativamente diferente del control ($p < 0,05$; prueba t de Student).

Como puede verse en la tabla 1, el tratamiento con DDC inhibió la actividad hepática de ferroquelatasa, como se esperaba. La actividad de la enzima en adrenal también fue disminuida significativamente por DDC.

Tabla 1. Efecto de DDC sobre las actividades de ferroquelatasa y ALA-s y sobre el contenido de porfirinas en glándula adrenal y en hígado. Se midieron las actividades de ferroquelatasa y ALA-s y el contenido de porfirinas en ratas controles y tratadas con DDC (como se indica en métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E. S. de duplicados y son representativos de 3 experimentos.

* Significativamente diferente del control ($p < 0,01$; prueba t de Student).

** Significativamente diferente del control ($p < 0,05$; prueba t de Student).

Tratamiento		Actividad de ferroquelatasa (nmol MESO/mg de proteína por hora)	Actividad de ALA-s (pmol ALA/mg de tejido por hora)	Contenido de porfirinas (Unidades arbitrarias de fluorescencia/ 100 mg de tejido)
<i>Adrenal</i>	Control	1.8 \pm 0.4	11.6 \pm 3.9	7.8 \pm 0.6
	DDC	0.8 \pm 0.2 *	28.5 \pm 0.4 **	10.8 \pm 1.0 **
<i>Hígado</i>	Control	18.8 \pm 0.2	9.9 \pm 0.6	3.6 \pm 0.4
	DDC	9.8 \pm 1.8 *	23.6 \pm 1.9 **	8.3 \pm 1.0 **

Para evaluar si la disminución de la actividad de ferroquelatasa afectaba el contenido de hemo, se determinó la actividad de ALA-s, dado que esta enzima es inducida cuando la disponibilidad de hemo disminuye. Se encontró un incremento significativo de la actividad de ALA-s, tanto en hígado como en adrenal, en las ratas tratadas con DDC respecto de las ratas controles (tabla 1) lo que indicaría una disminución del contenido de hemo por tratamiento con DDC en adrenal.

Por otro lado, dado que el bloqueo de ferroquelatasa provoca una acumulación de protoporfirina IX, se quiso analizar el contenido de porfirinas en hígado y adrenal de ratas tratadas con DDC. Se encontró que el contenido de porfirinas en ambos órganos se incrementaba significativamente por tratamiento con DDC (tabla 1).

De acuerdo a nuestros resultados, DDC inhibe la actividad de ferroquelatasa tanto en hígado como en adrenal de rata lo que provoca una acumulación de porfirinas y una disminución de los niveles de hemo que se reflejan en un aumento de la actividad de ALA-s.

Es decir que DDC es capaz de bloquear la biosíntesis de hemo en adrenal de rata al igual que en hígado.

3.1.3 Efecto del DDC sobre la síntesis de esteroides en adrenal

Como se sabe que ACTH estimula la producción de aldosterona y corticosterona en adrenal, y dado que los citocromos P 450 esteroideogénicos son holoenzimas que se caracterizan por tener al hemo como grupo prostético, se quiso investigar si el tratamiento con DDC afecta la estimulación de la producción de aldosterona y corticosterona mediada por ACTH. Ratas controles o tratadas con DDC por 5 hs se infundieron con ACTH o solución fisiológica. Como puede verse en la figura 7, la infusión de ACTH produjo un marcado aumento del contenido de corticosterona y aldosterona en adrenal como se esperaba.

El tratamiento previo con DDC bloqueó parcialmente el incremento del contenido de esteroides provocado por ACTH en adrenal mientras que no afectó el contenido de esteroides en animales controles. Para evaluar si era posible mejorar este efecto agudo del DDC con un tratamiento más prolongado con la droga, se trataron ratas con DDC por 8 ó 20 hs en lugar de 5 hs. No se encontró una mejoría del efecto inhibitorio de DDC

sobre la acción de ACTH, más aún, el tratamiento de 20 hs no mostró una inhibición significativa de la respuesta de ACTH.

En concordancia con estos resultados, se ha informado que el tratamiento a ratas con DDC por 5 hs inhibió ferroquelatasa y estimuló ALA-s y el contenido de porfirinas en hígado, pero a tiempos más largos de tratamiento con DDC, desaparecían las dos últimas estimulaciones mientras que la ferroquelatasa permanecía inhibida. La pérdida de la estimulación de ALA-s sugiere que el contenido de hemo fue parcialmente restaurado a tiempos más largos después de la administración de DDC (De Matteis, 1973). Aparentemente, con el tratamiento de 5hs con DDC hay una disminución rápida del contenido de hemo que tiende a recobrase a tiempos más largos.

Por otro lado, como hemos visto que el agregado de hemina a homogenatos de adrenal de rata estimula la producción de aldosterona y corticosterona a partir de DOC, se quiso examinar el efecto de la administración *in vivo* de hemina sobre la síntesis de esteroides en adrenal de rata. Se encontró que ratas infundidas con hemina tenían un aumento significativo del contenido de aldosterona y corticosterona en adrenal (Figura 7).

En los animales tratados con DDC se produjo un bloqueo del aumento de la producción de aldosterona y corticosterona mediada por ACTH. Este bloqueo fue parcialmente revertido por la administración de hemina (Figura 7), lo que confirma que el efecto inhibitorio del DDC sobre la síntesis de esteroides se debe a una disminución del contenido de hemo.

De acuerdo a estos resultados hemina estimula la biosíntesis de esteroides en corteza adrenal de rata y además, la estimulación de la producción de esteroides por ACTH se ve disminuida si los niveles de hemo están disminuidos, es decir que la disponibilidad de hemo afecta el aumento de la producción de esteroides mediada por ACTH.

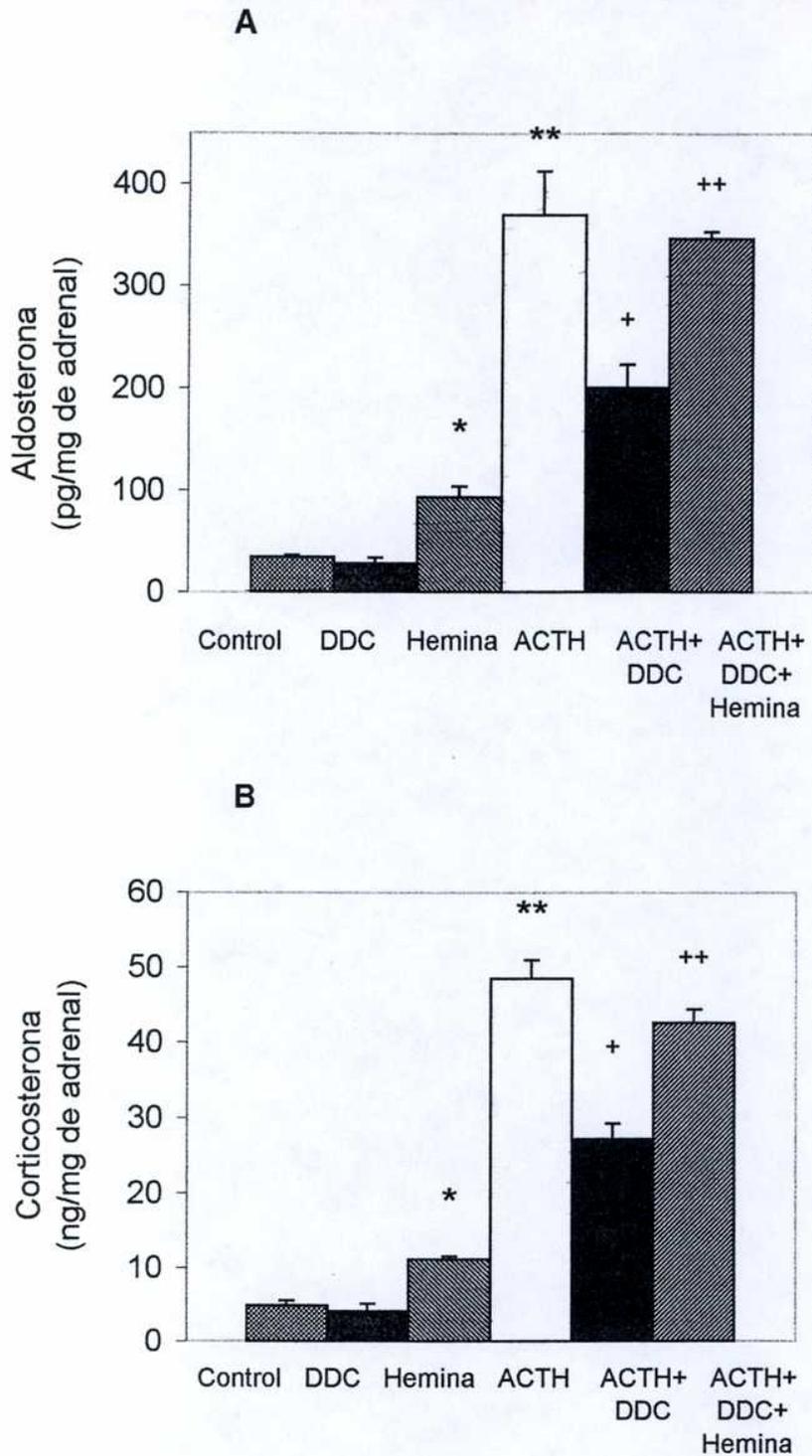


Figura 7. Efecto de hemina sobre la producción de aldosterona. Reversión parcial del bloqueo producido por DDC. Se inyectaron ratas con vehículo o DDC. Luego de 5 hs, las ratas controles o tratadas con DDC, fueron infundidas con solución salina o hemina (67mg/kgxmin.) durante 30 min., después con solución salina o ACTH (100ng/kgxmin.) por otros 30 min. Finalmente se mataron las ratas y se extrajeron las adrenales. Se prepararon homogenatos y se centrifugaron a 6000 x g durante 20 min. Se midieron aldosterona (A) y corticosterona (B) en los

sobrenadantes. Los resultados expresan el promedio \pm E.S. de duplicados y son representativos de 3 experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al control, ** $p < 0.01$ con respecto al control, + $p < 0.05$ con respecto a ACTH + DDC (prueba t de Student).

3.1.4 Efecto de fenobarbital sobre la producción de esteroides.

Para seguir adelante con estos estudios, quisimos evaluar si un estimulador de la síntesis de hemo en hígado, también estimula esta síntesis en adrenal y de ser así, si esto afecta la síntesis de esteroides.

El fenobarbital (FB) es un conocido inductor del citocromo P-450 hepático, que no sólo induce la síntesis del apocitocromo P-450, sino también, de su grupo prostético, el hemo, mediante la inducción de la enzima primera y regulatoria de su camino biosintético: ALA-s (Srivastava, 1989; Rangarajan, 1989).

Teniendo en cuenta los trabajos previos en los que se induce ALA-s en hígado con FB inyectamos intraperitonealmente ratas con esta droga (80 mg/kg de peso en 1 ml de solución fisiológica). Luego de 24 horas, matamos las ratas controles y tratadas con FB y medimos la actividad de ALA-s en hígado por el método de Marver (Marver, 1966). Como no obtuvimos aumento de la actividad de esta enzima, probamos distintas dosis de FB, distintos tiempos de tratamiento y formas de administración de la droga (inyección intraperitoneal o en el agua de bebida).

Primero probamos utilizar una dosis mayor de FB (100 mg/kg de peso en 1 ml de solución fisiológica) y matamos a los animales 18 ó 24 hs después de la inyección, pero tampoco encontramos aumento de la actividad de la enzima ni en hígado ni en adrenal. Intentamos luego, cambiando la forma de administración de la droga, se suministró el FB en el agua de bebida durante 18 hs ó durante 1, 2, 5, 7 y 10 días. Tampoco obtuvimos aumentos significativos de la actividad de la enzima.

Luego probamos nuevamente con inyecciones intraperitoneales, pero ahora utilizando dos dosis de FB de 60 mg/kg, administradas 48 y 24 horas antes de matar a los animales por decapitación. Con este tratamiento, logramos un aumento significativo de ALA-s en hígado (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de FB sobre la actividad de ALA-s en hígado de rata. Se midió la actividad de ALA-s en homogenatos de hígado de ratas tratadas con solución fisiológica o FB como se indica en Métodos.

* Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (Test t de Student).

	Actividad de ALA-s (nmol ALA/g de hígado por hora)
Control	6,49 \pm 1,15
FB	11,64 \pm 2,93 *

Cuando analizamos en estas mismas ratas la actividad de ALA-s en adrenal, no detectamos aumento significativo de esta actividad enzimática, sin embargo encontramos un aumento del contenido de aldosterona y corticosterona en las adrenales provenientes de estas ratas (Figura 8). Es decir que pese a no detectarse aumento de ALA-s en adrenal por tratamiento con fenobarbital, éste tratamiento produjo estimulación de la síntesis de esteroides. Si bien podría haber algún efecto distinto de fenobarbital que provoca la estimulación de la síntesis de esteroides, es posible que, como el método de detección de ALA-s no es muy sensible, la enzima estuviera, en realidad, algo aumentada, produciendo un aumento de los niveles de hemo en adrenal, lo que se traduce en un aumento de la síntesis de esteroides.

En favor de esta hipótesis, se sabe que el promotor del gen de ALA-s hepática, que es el mismo que se expresa en adrenal, es estimulado por fenobarbital (Varone, 1999; Podvinec 2004).

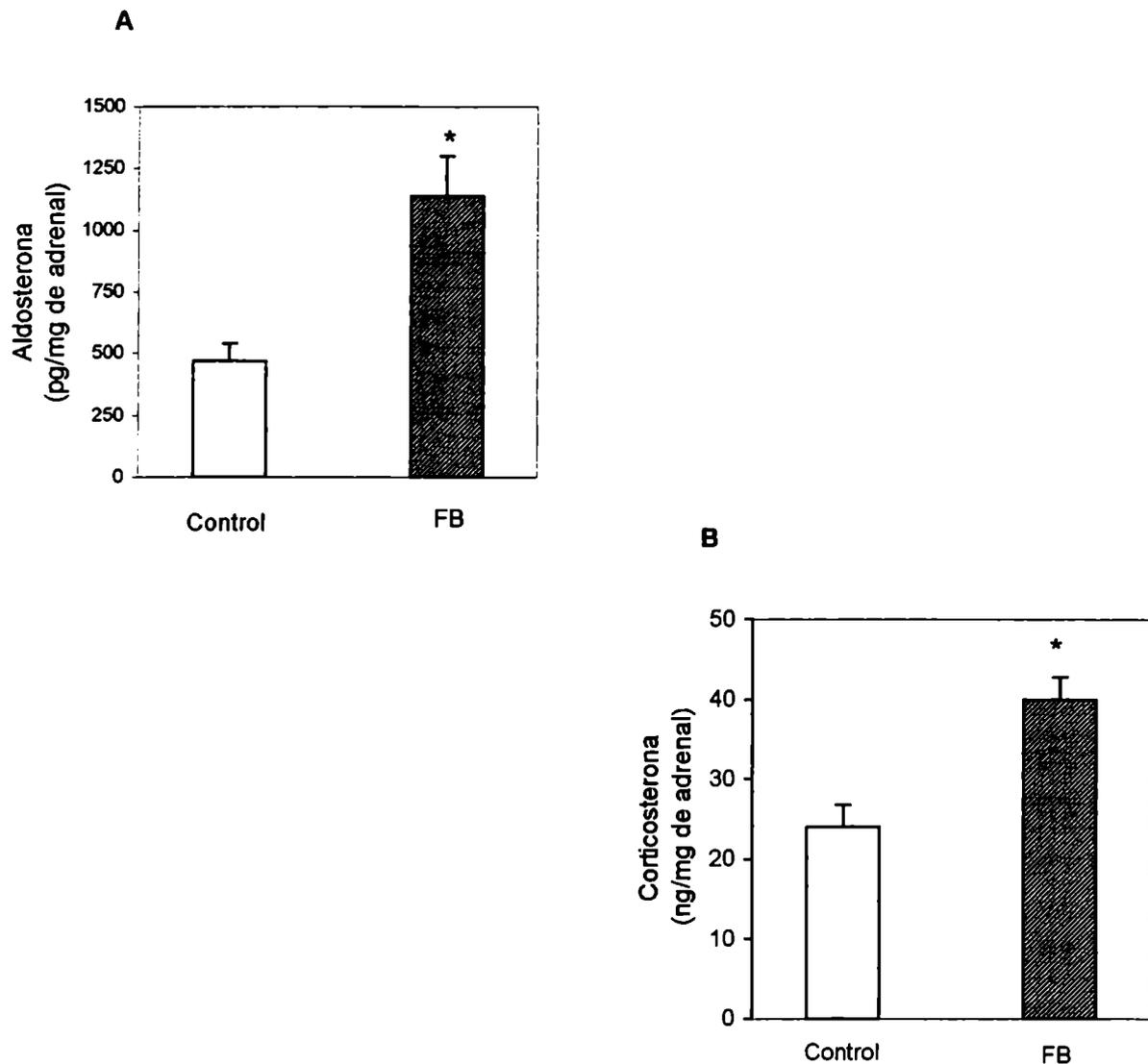


Figura 8. Efecto de FB sobre el contenido de aldosterona y corticosterona en adrenal de rata. Se trataron ratas con vehículo o FB por 48 hs (2 dosis de 60 mg/kg de peso). Luego de este tratamiento los animales se mataron, se extrajeron las adrenales y se prepararon homogenatos que se centrifugaron a 6000 rpm x min. Aldosterona (A) y corticosterona (B) se midieron en los sobrenadantes por RIA.

* Significativamente distinto del control, $p < 0,001$ (Test t de Student)

3.1.5. Efecto de inductores de la síntesis de esteroides sobre los niveles de mRNA DE ALA-S Y CYP-21.

Como hemos señalado, los mensajeros del apocitocromo P-450 y de ALA-s, enzima responsable de la síntesis del grupo prostético hemo, son inducidos simultáneamente por fenobarbital en el hígado (Hamilton, 1988; Srivastava, 1989) y, según algunos informes, el hemo actuaría como modulador positivo de la expresión del apocitocromo P-450 en hígado (Dwarki, 1987; Rangarajan, 1989).

En la síntesis de esteroides participan distintos citocromos P450. Consistente con este hecho, se ha visto que en ratas tratadas por 48hs con un estimulador de la síntesis de esteroides en testículos, la HCG (gonadotrofina coriónica humana), se produce un aumento del mensajero de ALA-s (Srivastava, 1988).

Por otro lado, algunos de los estimuladores de la síntesis de esteroides en adrenal, como ACTH, endotelina y angiotensina, son capaces de inducir distintos citocromos involucrados en la síntesis de esteroides, por ejemplo, se ha informado que ACTH aumenta el mRNA de CYP21 (John, 1986) y endotelina aumenta la transcripción de aldosterona sintetasa (Rossi, 1997). Sin embargo, no se ha estudiado si afectan la síntesis de ALA-s.

Teniendo esto en cuenta, se quiso investigar si un estimulador de la síntesis de glucocorticoides como ACTH y un estimulador de la síntesis de mineralocorticoides como endotelina producen un aumento de los niveles de mRNA de ALA-s en adrenal y si se afectan los niveles del mRNA de CYP21, un citocromo P450 que participa tanto en la síntesis de glucocorticoides como de mineralocorticoides.

3.1.5.1 Efecto de ACTH sobre el mRNA de Ala-s cuantificado por Northern-blot.

Con el fin de estudiar el efecto de ACTH sobre los niveles de mRNA de ALA-s, se puso a punto la técnica de Northern-blot, lo que requirió la preparación de una sonda radioactiva para detectar al mRNA de la enzima.

El gen de ALA-s de rata ha sido clonado y secuenciado de una genoteca de hígado (Yamamoto, 1988) y se ha visto que el mismo mRNA está presente en distintos tejidos de rata como: riñón, corazón, cerebro, testículos y adrenal (Srivastasa, 1988).

Este es el gen constitutivo que se expresaría en todos los tejidos para satisfacer la demanda de hemo para la síntesis de citocromos y otras hemoproteínas mientras que, el otro gen corresponde al ALA-s eritrocitaria, que se expresa solamente en células eritroides para obtener hemo durante la producción de hemoglobina.

El clon que contiene el cDNA de ALA-s hepática fue gentilmente cedido por el Dr. Yamamoto. Para construir la sonda radioactiva se transformaron bacterias *E. coli* en medio LB con ampicilina con el plásmido conteniendo el cDNA de ALA-s y el gen de resistencia al antibiótico. Se extrajo el DNA plasmídico del clon de *Escherichia coli* seleccionado, se purificó el inserto de 1972 pb y se realizó la marcación con (α ^{32}P) dCTP para obtener la sonda radioactiva para ALA-s. Una vez preparada la sonda, se utilizó para cuantificar el mRNA de ALA-s en adrenales de ratas controles y tratadas con ACTH.

Se encontró que la inyección de ratas con una mezcla de 5 UI de Acthelea Corticotropina de acción rápida y 4 UI de Acthela Gel Corticotropina de acción retardada, 48 y 24hs antes de matar a los animales, produjo un aumento significativo del contenido de corticosterona en adrenal (Tabla 3).

Se utilizó este tratamiento para analizar el efecto de la hormona sobre el mRNA de ALA-s. Después de aislar el RNA total de las adrenales de las ratas controles y tratadas con ACTH, se cuantificó por Northern blot el mRNA de ALA-s.

Se requirieron 15 días de exposición de la placa fotográfica para visualizar la banda correspondiente al mRNA de ALA-s de adrenal en la autoradiografía. Se encontró una banda cuya posición coincide con la informada anteriormente para el mRNA de ALA-s en hígado de rata cuyo tamaño es de 2,3 Kb (Srivastava, 1992). Sin embargo, no se detectó aumento del mRNA de ALA-s con este tratamiento hormonal (Figura 9).

Tabla 3. Efecto del tratamiento crónico de ACTH sobre el contenido de corticosterona en homogenato de adrenal de rata.

	Corticosterona (ng/mg de adrenal)
Control	25 ± 3
ACTH	104 ± 18

* Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (Test t de Student).

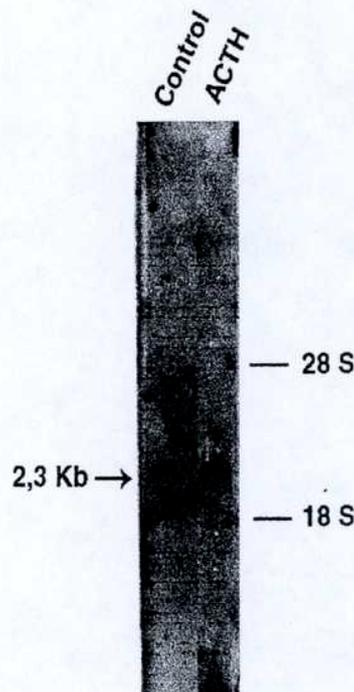


Figura 9. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de ALA-s en adrenal de rata. Se aisló RNA total de adrenal de ratas tratadas con vehículo (controles) o con ACTH (una mezcla de 5 UI de Acthelea Corticotropina de acción rápida y 4 UI de Acthela Gel Corticotropina de acción retardada, 48 y 24hs antes de matar a los animales). Se analizó el mRNA de ALA-s por Northern-blot utilizando una sonda radioactiva, como se indica en Métodos. Se muestra la posición del RNA 18S y 28S.

Dado que la sonda radioactiva estaba marcada con ^{32}P que decae rápidamente, se decidió preparar una sonda biotinilada para el mRNA de ALA-s porque estas sondas son estables por un año aproximadamente y se tenía experiencia en el empleo y preparación de este tipo de sonda, pues se había utilizado una sonda biotinilada para aislar y secuenciar el clon que contiene el gen de CYP 21 de una genoteca de glomerulosa de rata (Zhou, 1997).

Se preparó, entonces una sonda biotinilada de RNA antisentido para el mRNA de ALA-s. Con este fin se diseñaron primers de PCR utilizando el programa Gene Jockey de modo de obtener un producto de PCR de aproximadamente 400 pb. Se agregó la secuencia del promotor del fago T7 en el extremo 5' del primer antisentido. El fragmento de DNA presente en el plásmido que contiene el gen de ALA-s hepática, se amplificó por PCR utilizando estos primers. Después de aislar y purificar el fragmento de DNA producto de la PCR que contiene el promotor de T7 río arriba del gen de interés, se utilizó este DNA como templado en un ensayo de transcripción *in vitro* utilizando T7 polimerasa y una mezcla de nucleótidos incluyendo CTP-14-biotina, para generar un RNA antisentido biotinilado de 413 nucleótidos.

Cuando se utilizó la sonda biotinilada para determinar la presencia del mRNA de ALA-s por Northern-blot en las mismas preparaciones de RNA de adrenal de rata utilizadas previamente, no se obtuvo señal para el mRNA de ALA-s. Esto nos exigió modificar la metodología para la medición de este mensajero, como veremos adelante (Sección 3.1.5.3).

3.1.5.2 Efecto de ACTH sobre el mRNA de CYP-21 cuantificado por Northern-blot

Con la idea de poder evaluar el incremento de la síntesis de apocitocromos involucrados en la síntesis de esteroides en adrenal por tratamiento con ACTH, se analizó el mRNA de CYP-21 por Northern-blot con una sonda biotinilada de RNA antisentido.

Para preparar esta sonda, un plásmido que contiene el gen de esta proteína de adrenal de rata bajo el control del promotor de T7, se linealizó con una enzima de restricción apropiada (Xba1) de modo de obtener por transcripción *in vitro* un RNA antisentido como se describió anteriormente (Zhou, 1997).

Cuando se utilizó la sonda biotinilada preparada para determinar la presencia del mRNA de CYP-21 por Northern-blot (Figura 10) en preparaciones de RNA de adrenal de rata, la sonda de CYP-21 detectó la presencia de este mRNA en adrenal y la banda obtenida es similar a la previamente encontrada en adrenal de rata (Zhou, 1997). Sin embargo, el tratamiento de ratas con ACTH 48 y 24 hs antes de matar a los animales, no mostró un aumento del mRNA de este citocromo.

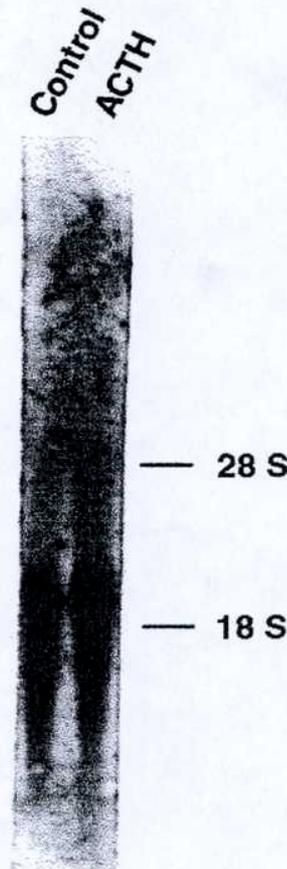


Figura 10. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de CYP-21 en adrenal de rata. Se aisló RNA total de adrenal de ratas tratadas con vehículo (controles) o con ACTH (una mezcla de 5 UI de Acthelea Corticotropina de acción rápida y 4 UI de Acthela Gel Corticotropina de acción retardada, 48 y 24hs antes de matar a los animales). Se analizó el mRNA de ALA-s por Northern-blot utilizando una sonda biotinilada, como se indica en métodos. Se muestra la posición del RNA 18S y 28S.

3.1.5.3 Efecto de ACTH sobre el mRNA de ALA-s y CYP21 cuantificados por RPA

Cuando se utilizaron las sondas biotiniladas para determinar la presencia de los mRNA de ALA-s y de CYP-21 por Northern-blot en preparaciones de RNA de adrenal de rata, mientras la sonda de CYP-21 detectó la presencia de este mRNA en adrenal no obtuvimos señal para el mRNA de ALA-s. Por otro lado, la señal detectada para el mRNA de ALA-s con la sonda radioactiva marcada con ^{32}P , fue muy débil y se requirieron 15 días de exposición de la placa fotográfica para detectarla. Por ello, para cuantificar el mRNA de ALA-s en adrenal decidimos poner a punto ensayos de protección a ribonucleasa (RPA), que son al menos 10 veces más sensibles que el Northern-blot. Se usó la sonda biotinilada preparada para realizar los ensayos de RPA.

Encontramos que esta sonda biotinilada de ALA-s reconocía un fragmento de 413 nucleótidos (nt) en adrenal, como era de esperar, y la señal detectada era proporcional a la cantidad de RNA utilizada (Figura 11), por lo que esta técnica podía ser utilizada para cuantificar al mRNA de ALA-s.

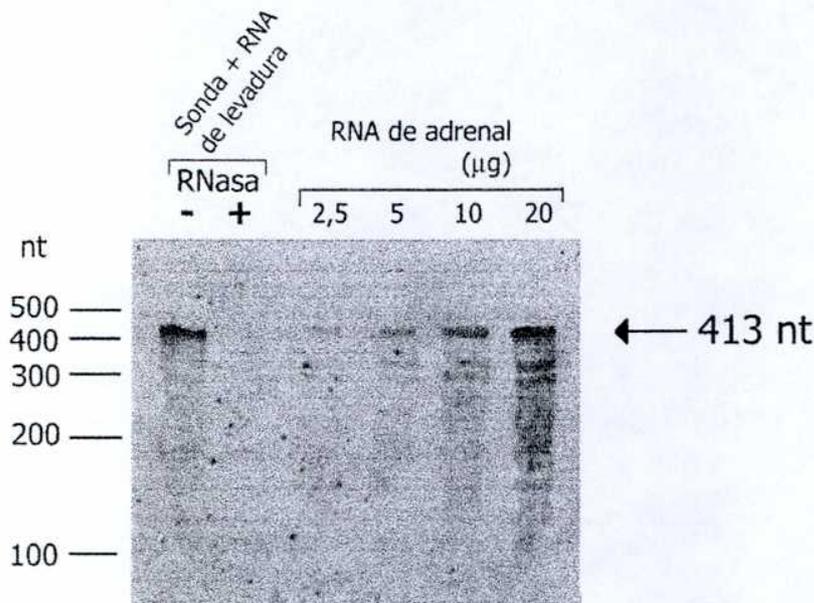


Figura 11. Cuantificación del mRNA de ALA-s en adrenal por RPA. Se analizaron distintas cantidades de RNA de adrenal de rata para verificar la correlación de la señal obtenida con la cantidad de muestra sembrada.

Para confirmar que esta sonda era capaz de cuantificar variaciones en el contenido del mRNA de ALA-s, la utilizamos para analizar el mRNA de esta enzima en preparaciones de RNA de hígado provenientes de ratas controles o ratas tratadas con AIA y DDC, que son conocidos inductores de la actividad de esta enzima en hígado (De Matteis, 1988; Cole, 1984; Marks, 1988). Como puede verse en la figura 12, encontramos aumento del mRNA de ALA-s en los hígados de ratas tratadas con AIA y DDC.

El patrón de bandas encontrado en el hígado (Figura 12), fue similar al que obtuvimos al cuantificar el mRNA de ALA-s en adrenal (Figura 11), no se obtiene una sola banda a 413 nt sino que también aparecen bandas de peso molecular menor. Estas bandas parecen provenir del mRNA de ALA-s, dado que también se incrementaron por tratamiento con AIA y DDC en el hígado y se obtuvieron tanto en hígado como en adrenal donde se expresa el mismo mensajero de ALA-s.

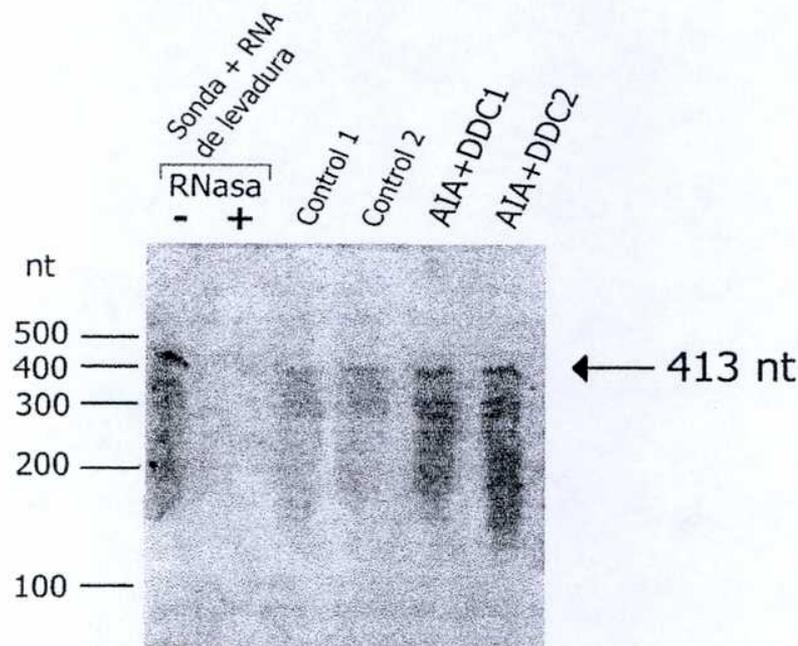


Fig. 12. Aumento del mRNA de ALA-s producido por un conocido inductor de esta enzima en hígado. Se trataron ratas con vehículo (controles) o con AIA+DDC por 6 hs. Se mataron las ratas, se extrajeron los hígados y se obtuvo el RNA. El mRNA de ALA-s se dosó por RPA usando una sonda biotinilada que protege un fragmento de 413 nucleótidos.

A partir de los resultados de las figuras 11 y 12, corroboramos que podemos utilizar el ensayo de RPA con la sonda biotinilada para analizar el contenido del mRNA de ALA-s en adrenal.

Puesto que, luego del tratamiento de ratas con inyección subcutánea de ACTH 48 y 24 hs antes de matarlas, no habíamos encontrado efecto de la hormona sobre el mRNA de ALA-s ni el de CYP-21 cuantificados por Northern-blot, se pensó en evaluar este efecto en ratas infundidas con ACTH, teniendo en cuenta que nuestros estudios previos con ACTH, hemina y DDC fueron hechos en ratas infundidas y con este tratamiento teníamos una buena respuesta hormonal.

La infusión de ratas con ACTH por 1 hora produjo un importante incremento de corticosterona en sangre (Tabla 4).

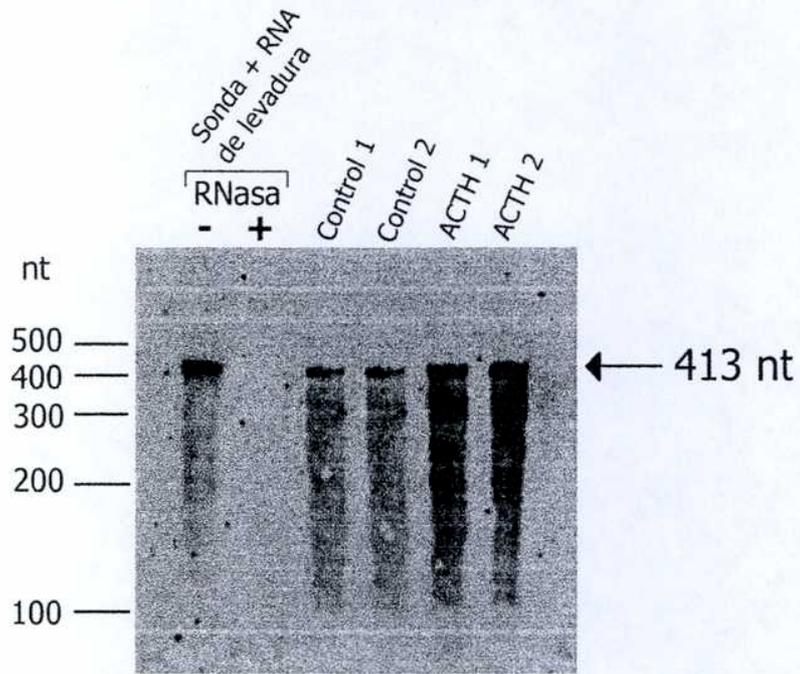
Tabla 4. Efecto de ACTH sobre el contenido de corticosterona en suero.

	Corticosterona (ng/ml de suero)
Control	23 ± 1
ACTH	207 ± 21 *

* Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (Test t de Student).

Con el objeto de evaluar si el incremento en la biosíntesis del esteroides coexiste con un incremento en la biosíntesis de hemo se analizó por RPA el mRNA de ALA-s, usando la sonda biotinilada de RNA antisense, que reconoce un fragmento de 413 nt. Como puede verse en la Figura 13, hubo un incremento en el mRNA de ALA-s por tratamiento con ACTH.

A



B

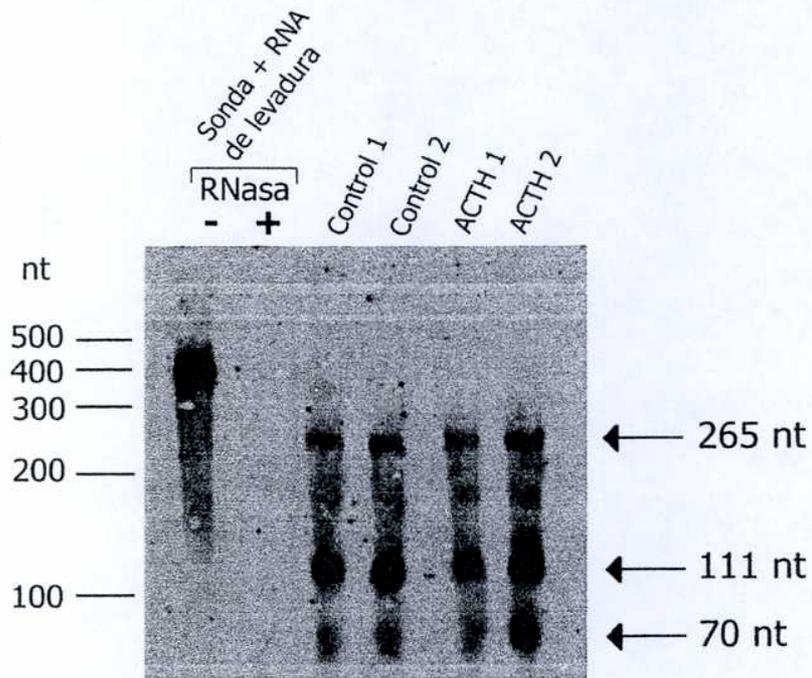


Figura 13. Efecto del tratamiento con ACTH sobre el mRNA de ALA-s y CYP-21 en adrenal de rata. Se infundieron ratas con vehículo (controles) o con ACTH por 1 h. Se mataron las ratas, se extrajeron las adrenales y se obtuvo el RNA. Los mRNAs de ALA-s (A) y CYP-21 (B) se dosaron por RPA como se indica en Métodos.

Para determinar si el tratamiento con ACTH incrementa la síntesis de apocitocromo P450, se cuantificó en la misma muestra el mRNA de CYP21, un citocromo involucrado tanto en la síntesis de glucocorticoides como de mineralocorticoides. La sonda preparada para CYP21 detecta dos transcritos expresados en adrenal de rata, y protege un fragmento de 265 nt a partir de uno de los transcritos que contiene el intrón 9 y dos fragmentos de 111 y 70 nt del otro transcripto que no contiene el intrón, como fue previamente publicado (Zhou, 1997)). Se encontró que ACTH no afectó al mRNA de CYP21 bajo estas condiciones de tratamiento (Figura 13) a pesar del incremento observado en el mRNA de ALA-s en la misma muestra.

3.1.5.4 Efecto de ACTH sobre la actividad de ALA-s en adrenal de rata

Por otro lado, se quiso evaluar si este aumento del mRNA de ALA-S se correspondía con un aumento en la actividad enzimática. Se encontró que la infusión de ratas con ACTH durante 30 minutos también incrementa la actividad de ALA-s en adrenal de rata (Tabla 5). Es decir que el aumento de la producción de esteroides mediado por ACTH estuvo acompañado por un aumento del mRNA y la actividad de ALA-s.

Tabla 5. Efecto de ACTH sobre la actividad de ALA-s en adrenal de rata. Se midió la actividad de ALA-s en homogenatos de adrenal de ratas infundidas con vehículo o ACTH (ver métodos).

* Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (Test t de Student).

	Actividad de ALA-s (nmol/mg de adrenal por hora)
Control	$13,3 \pm 1,0$
ACTH	$27,9 \pm 3,7 *$

3.1.5.5 Efecto de endotelina sobre el mRNA de ALA-s y CYP21 cuantificado por RPA

También se estudió el efecto de un estimulador de la biosíntesis de mineralocorticoides, endotelina.

Se encontró que una hora de infusión con endotelina causó un incremento significativo en la biosíntesis de aldosterona en adrenal (Tabla 6) como ya fue informado (Pecci,1993).

Se analizó la cantidad de mensajero de ALA-s y CYP21 en las adrenales de estas ratas (Figura 14), encontrando que endotelina causó un incremento en el mRNA de ALA-s sin afectar significativamente el mRNA de CYP21.

Es decir que, de acuerdo a nuestros resultados, la infusión de ratas con estimuladores de la síntesis de esteroides en adrenal como ACTH y endotelina esta acompañada con un aumento de la síntesis de ALA-s aunque no se observó aumento de la síntesis de apocitocromos.

Tabla 6. Efecto de endotelina sobre el contenido de aldosterona en adrenal.

	Aldosterona (ng/mg de adrenal)
Control	0,13 ± 0,06
Endotelina	3,52 ± 0,48 *

* Significativamente diferente del control, $p < 0,05$ (Test t de Student).

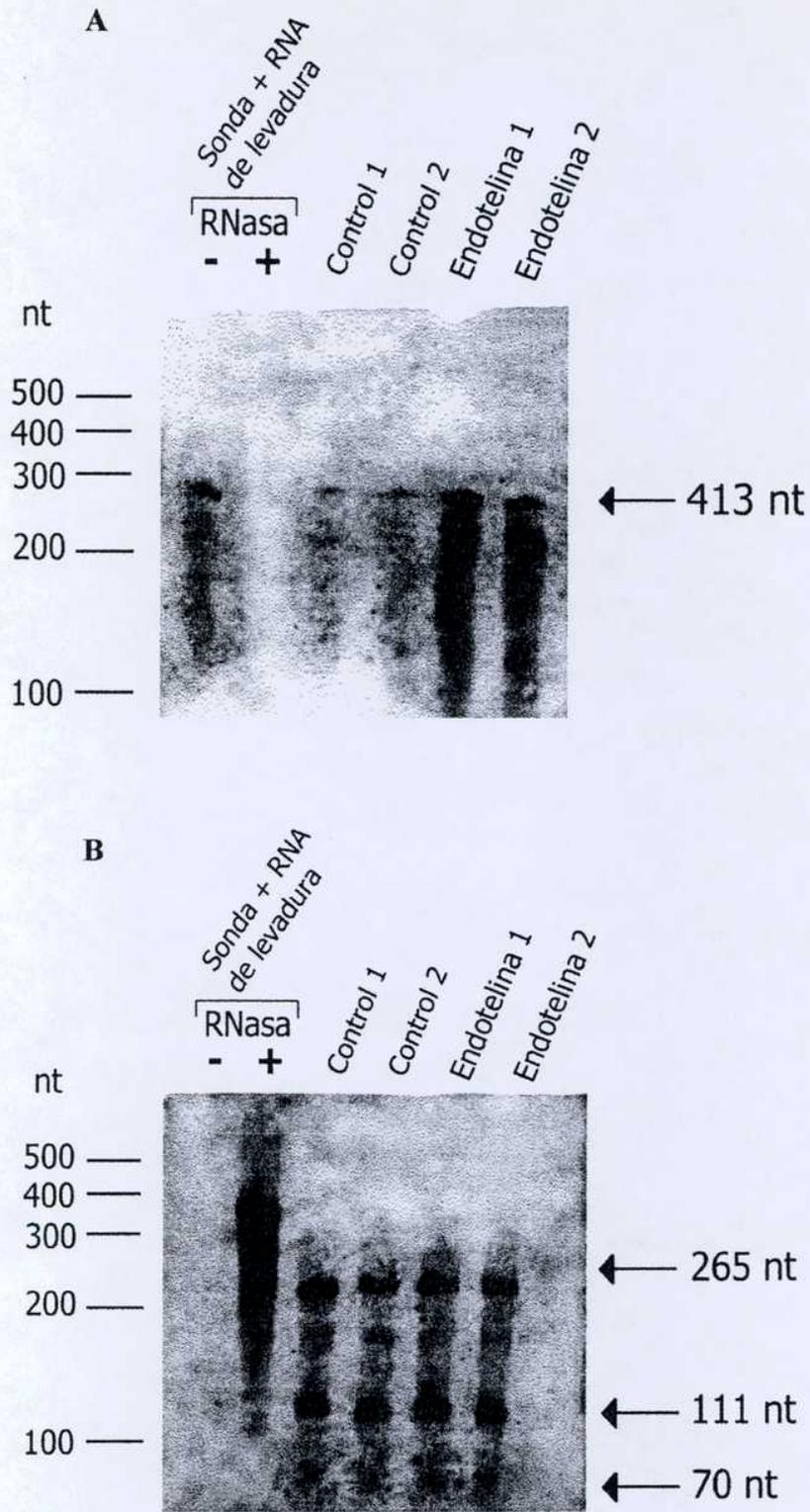


Figura 14. Efecto del tratamiento con endotelina sobre el mRNA de ALA-s y CYP-21 en adrenal de rata. Se infundieron ratas con vehículo (controles) o con endotelina por 1 h. Se mataron las ratas, se extrajeron las adrenales y se obtuvo el RNA. Los mRNAs de ALA-s (A) y CYP-21 (B) se dosaron por RPA como se indica en Métodos.

3.2 Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata

La existencia de anclas de GPI en adrenal fue informada por primera vez por Igarashi y Chambaz (Igarashi, 1987). Se ha visto que ACTH es capaz de hidrolizar GPI en células de corteza adrenal bovina (Cozza, 1988).

El lipopeptidofosfoglicano (LPPG) de *Trypanosoma cruzi* es una glicoinositolfosfoceramida cuya estructura fue descrita por el grupo de la Dra. Lederkremer (Lederkremer, 1990; Lederkremer, 1991) y pertenece a la familia de los GPIs. Por hidrólisis del LPPG con una fosfolipasa C se libera ceramida e IPG.

Se encontró que el tratamiento de células adrenocorticales con ACTH por 8 minutos incrementa la liberación de ceramida a partir de LPPG, lo cual indica la activación de una GPI-fosfolipasa C (Vaena de Avalos, 1998).

Es sabido que por activación de GPI-fosfolipasa C se libera IPG al medio extracelular el cual entra en la célula por un sistema de transporte específico (Alvarez, 1991; Müller, 1994).

Un IPG purificado de *Trypanosoma cruzi*, cuando es agregado a preparaciones de células adrenocorticales, es capaz de inhibir la acumulación provocada por ACTH de aldosterona y cortisol en células adrenocorticales de vaca y de aldosterona y corticosterona en células adrenocorticales de rata (Vila, 1995; Vaena, 1998). El efecto inhibitorio de IPG sobre la respuesta de ACTH, está de acuerdo con lo que se ha informado acerca de la inhibición de adenilato ciclasa y de PKA y de la activación de fosfodiesterasa por IPG, pues esto resultaría en una inhibición de la respuesta por AMPc (Saltiel, 1987; Villalba, 1988) que es el segundo mensajero en la respuesta del receptor de ACTH.

Por otro lado, se había visto que el tratamiento de células adrenocorticales de rata con ACTH en presencia de anticuerpos anti-IPG produce un aumento de la acumulación de corticosterona con respecto al tratamiento con la hormona solamente. Esto indicaría la presencia de un IPG capaz de inhibir la respuesta de ACTH en las preparaciones de células tratadas con la hormona.

En el presente trabajo, para continuar con esta línea de investigación y teniendo en cuenta que: IPG es liberado de GPI por una GPI-fosfolipasa C y que esta enzima es

activada por ACTH, resulta interesante investigar la acción de GPI- fosfolipasa C durante la estimulación hormonal.

Se informó previamente que ACTH incrementa la liberación de una enzima anclada a la membrana celular por GPI, la fosfatasa alcalina, por lo tanto, esta enzima es un posible sustrato de GPI-fosfolipasa C. Quisimos investigar esta posibilidad.

En realidad, la liberación de FAL al medio extracelular ha sido anteriormente considerada indicativa de activación de GPI-PLC (Romero, 1988; Roberts, 1990), sin embargo, no se puede descartar activación de otro tipo de hidrolasas. Actualmente, se conocen fosfolipasas específicas de GPI de tipo C (GPI-PLC) y de tipo D (GPI-PLD) capaces de liberar proteínas de la superficie celular (Metz, 1994; Muller, 1994). Además se ha reportado que ciertas proteínas son capaces de ser liberadas de la membrana celular conservando su ancla de GPI y luego se reasocian con otras membranas celulares (Kooyman, 1995). Por último, FAL podría liberarse por acción de una proteasa; si este fuera el caso, la proteólisis ocurriría sin bloquear la actividad enzimática.

En base a lo expuesto, se hacía necesario dilucidar qué hidrolasa era activada por ACTH para liberar FAL.

3.2.1 Evaluación de la participación de una fosfolipasa C en la liberación de FAL por ACTH

3.2.1.1 Estudios con TRITON X-114

El tratamiento con fosfolipasa C de una proteína anclada a una membrana por GPI produce por un lado, la liberación al medio extracelular de la proteína conteniendo el IPG (esta forma de la proteína es conocida como forma soluble) y por el otro lado, la retención en la membrana de la porción lipídica del ancla de GPI que puede ser acil y/o alquilglicerol o ceramida.

Un criterio para evaluar la pérdida del lípido del ancla de GPI, es determinar la presencia de la proteína en la fase acuosa después de una partición con tritón X-114.

El tritón X-114 es un detergente no iónico que se utiliza para separar compuestos anfifílicos de aquellos que no lo son. Este detergente forma una única fase a 0°C y luego de 10 minutos de incubación a 37°C se separan dos fases, una fase

inferior rica en detergente que es donde se encuentran los compuestos anfífilos y otra fase superior que contiene los compuestos hidrofílicos (Bordier, 1981).

Se ha visto que las proteínas que poseen un ancla de GPI son retenidas en la fase rica en detergente mientras que, luego del tratamiento de estas moléculas con fosfolipasa C, las formas solubles de estas proteínas pasan a la fase acuosa superior (Low, 1988 b).

Por tal razón, estudiamos la partición en tritón X 114 de la fosfatasa alcalina liberada al medio extracelular en células adrenocorticales de ratas controles y tratadas con ACTH. Encontramos que después del tratamiento con la hormona, el incremento con respecto a las células controles en la actividad de fosfatasa alcalina recuperada en el medio extracelular, era debido a la forma de la enzima que se extrae en la fase acuosa después de la partición con Tritón X-114 (Tabla 7). Este resultado indica la pérdida del GPI en la fosfatasa alcalina liberada por ACTH.

Tabla 7. Partición en tritón X 114 de la fosfatasa alcalina liberada al medio extracelular.

Células adrenocorticales de rata fueron tratadas con vehículo (controles) o con ACTH 1nm por 7 minutos, finalizado el tratamiento se centrifugaron a 900 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se sometieron a partición en tritón X114 y se midió la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) en la fase acuosa y detergente como se indica en Métodos.

	Actividad relativa de FAL (ACTH/control)
Fase acuosa	1,60 ± 0,10
Fase detergente	0,95 ± 0,05

En realidad, este resultado es consistente con la acción tanto de una fosfolipasa C o D, como de una proteasa, en este último caso quedaría retenido en la membrana el GPI unido a un péptido y también se liberaría una enzima libre de lípido.

3.2.1.2 Estudios con inhibidores de fosfolipasa C

Con el fin de evaluar si una proteasa o una fosfolipasa estaba involucrada en la liberación de fosfatasa alcalina, decidimos investigar el efecto de inhibidores de fosfolipasa C sobre la liberación mediada por ACTH de esta enzima.

Para descartar que estos inhibidores interfirieran con la unión de ACTH a su receptor o con su respuesta, es decir que actúen en un paso diferente a la inhibición de GPI-fosfolipasa C, decidimos analizar el efecto de los inhibidores sobre la acumulación de esteroides mediada por ACTH. Dado que, hemos visto que IPG inhibe la acción de ACTH, no es de esperar que la inhibición de GPI-fosfolipasa C, inhiba la acumulación de esteroides producida por la hormona.

El ácido p-cloromercurifenilsulfónico (pCMPSA) que es un conocido inhibidor de GPI-fosfolipasa C, es un bloqueante de grupos sulfidrilos (Butikofer, 1996). Cuando se estudio el efecto de este inhibidor sobre la acumulación de esteroides producida por ACTH, se encontró una disminución en esta acumulación (Figura 15), lo que sugiere que este inhibidor está interfiriendo con la respuesta de ACTH en un paso diferente al bloqueo de GPI-fosfolipasa C.

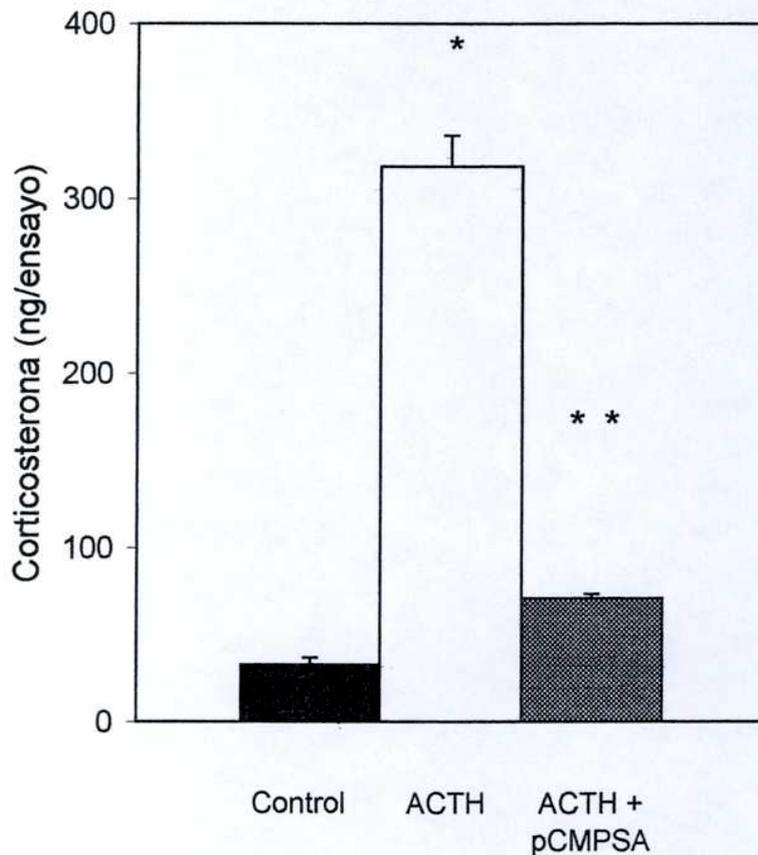


Figura 15. Efecto del pCMPSA sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con vehículo o con pCMPSA 250 μ M durante 30 minutos antes de la estimulación con vehículo o con ACTH 1 nM. Después de los tratamientos, se midió corticosterona por radioinmunoensayo (ver métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E.S. de tres determinaciones. *Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$ (ANOVA)

Dado que el inhibidor anterior no era específico para GPI-PLC, y con la idea de utilizar otro, se evaluaron varias evidencias que sugieren que una PI-fosfolipasa C puede estar involucrada en la hidrólisis de GPI. Por ejemplo, se sabe que las proteínas ancladas por GPI son hidrolizadas por una PI-fosfolipasa C bacteriana *in vitro* y se ha informado que dos GPI-fosfolipasa C, una purificada de *Trypanosoma brucei* y otra de maní, son capaces de hidrolizar fosfatidilinositol *in vitro* (Butikofer, 1996). Además se

vio que el fosfatidilinositol endógeno es hidrolizado bajo condiciones usadas para obtener la hidrólisis cuantitativa de VSG, proteína anclada por GPI que está presente en la membrana de *Trypanosoma brucei* (Butikofer, 1996). Por otro lado, se informó que uno de los integrantes de la familia de las PI-fosfolipasas C, la PI-fosfolipasa C- γ (2) media la hidrólisis de GPI en células estimuladas por eritropoyetina (Boudot, 2002).

Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar el efecto de un conocido inhibidor de PI-fosfolipasa C, U73122 (Yule, 1992; Waldron, 2000) sobre la liberación de fosfatasa alcalina.

Como puede verse en la Tabla 8, ACTH produce un incremento pequeño pero significativo en la liberación de esta enzima. En concordancia con esto, se informó previamente que insulina y EGF provocan un aumento pequeño pero cuantificable de la liberación de fosfatasa alcalina, la cual representa un porcentaje pequeño del total de la enzima presente en la superficie celular de Hep-2 (Roberts, 1990).

El pretratamiento de células adrenocorticales con U73122 por 30 minutos antes de la estimulación con ACTH, produjo una inhibición en la liberación de fosfatasa alcalina mediada por la hormona Tabla 8 y un incremento en la acumulación de corticosterona provocado por dicha hormona (Figura 16). El efecto de U73122 sobre la acumulación de esteroides indica que el inhibidor no bloquea la respuesta hormonal en un paso independiente de la inhibición de GPI-PLC y es concordante con una disminución en la producción de IPG.

Estos datos sugieren la participación de una PI-fosfolipasa C en esta acción de ACTH.

Tabla 8. Efecto del pretratamiento con U73122 sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH o AMPc en células adrenocorticales de rata. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con el inhibidor de fosfolipasa C, U73122 (10 μ M) o vehículo durante 30 min previamente a la estimulación con vehículo (control), ACTH (1 nM) o db-AMPc (1 mM) durante 7 min. Después de los tratamientos se midió la fosfatasa alcalina (FAL) (ver métodos). * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$; # Significativamente diferente de db-AMPc $p < 0,05$.

Pretratamiento	Tratamiento	Actividad de FAL (unidades/ 0,1 ml de sobrenadante)
Vehículo	Control	0,411 \pm 0,020
Vehículo	ACTH	0,609 \pm 0,012 *
Vehículo	db-AMPc	0,530 \pm 0,016 *
U73122	Control	0,413 \pm 0,005
U73122	ACTH	0,428 \pm 0,004 **
U73122	db-AMPc	0,416 \pm 0,001 #

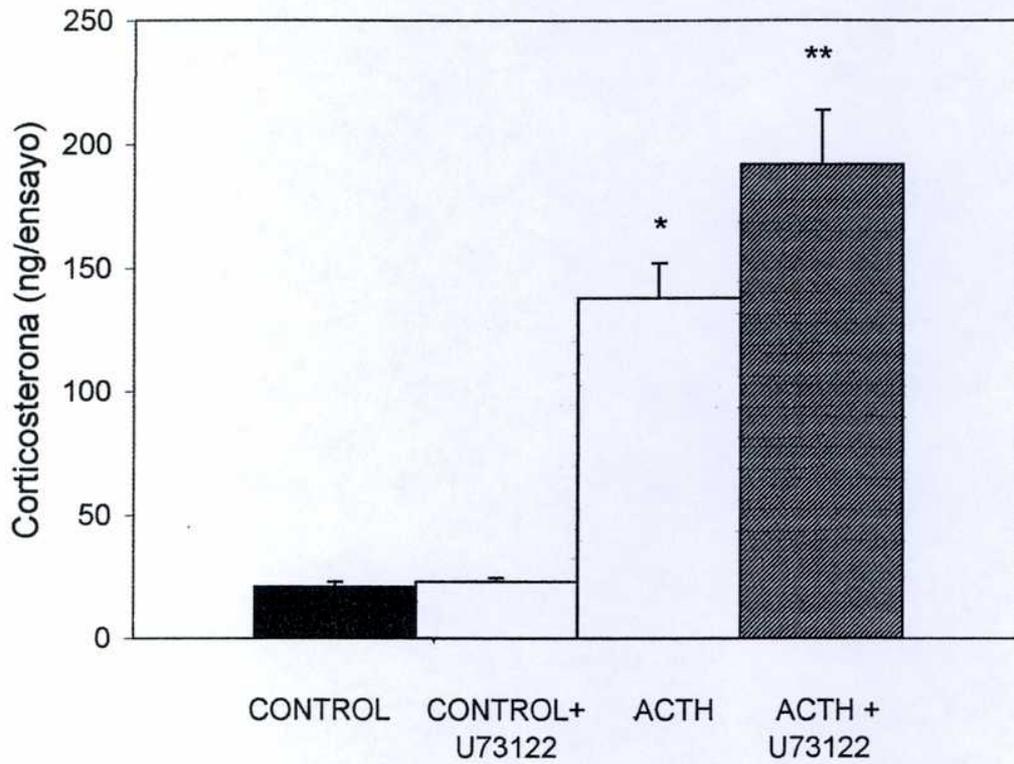


Figura 16. Efecto del U73122 sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con el inhibidor de fosfolipasa C, U73122 (10 μ M) o con vehículo durante 30 minutos antes de la estimulación con vehículo o con ACTH 1 nM. Después de los tratamientos, se midió corticosterona por radioinmunoensayo (ver métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E. S de tres determinaciones. *Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$ (ANOVA)

3.2.1.3 Estudios con inhibidores de la entrada de IPG en la célula

Para evaluar aún más la posibilidad que una fosfolipasa C sea responsable de la liberación de FAL por ACTH, analizamos la presencia de IPG en la FAL liberada usando inhibidores de la entrada de IPG a la célula.

Se informó previamente que por tratamiento con fosfolipasa C de membrana plasmática de adipocitos, la cantidad que se obtiene de dos proteínas ancladas por GPI, ectoproteína ligante de AMPc (Gce1) y lipoproteína lipasa (LPL), se ve incrementada cuando este tratamiento se hace en presencia de distintos inhibidores de la entrada de IPG (Müller, 1994).

Se propuso que las proteínas ancladas por GPI luego del clivaje lipídico, no son liberadas de la superficie celular, sino que estas se reasocian con las membranas plasmáticas a través de un receptor que reconoce específicamente al IPG (Müller, 1994; Müller, 2002).

Teniendo esto en cuenta, probamos el efecto de 2 inhibidores de la entrada de IPG, inositol-2-monofosfato (Deeg, 1993; Müller, 1994) y NaCl 2 M (Müller, 1994) sobre la cantidad de fosfatasa alcalina presente en el medio extracelular de células adrenocorticales de rata.

Se encontró que el tratamiento con inositol 2-monofosfato aumentó la cantidad de fosfatasa alcalina en el medio extracelular y este efecto, a pesar de estar también presente en las células controles, fue mayor en las células tratadas con ACTH (Tabla 9). Este resultado es consistente con la interacción de parte de la enzima liberada con receptores de IPG y apoya la idea de la presencia de IPG en la fosfatasa alcalina liberada tanto en células tratadas con ACTH como controles. Más aún, muestran que la cantidad de enzima que interactúa con el receptor fue mayor después del tratamiento con ACTH, lo cual indica que la entrada de IPG se incrementó en células adrenocorticales en presencia de ACTH. En realidad, de acuerdo a estos resultados, el efecto de ACTH sobre la liberación de fosfatasa alcalina fue subestimado en ausencia de inhibidores de la entrada de IPG debido a su unión a receptores de membrana.

El efecto del inositol 2-monofosfato es consistente con la presencia de IPG en la fosfatasa alcalina liberada y apoya aún más la participación de una fosfolipasa C en la liberación de la enzima por ACTH.

Tabla 9. Efecto del inositol 2-monofosfato y NaCl 2M sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con vehículo (control) o ACTH (1nM) solo o en combinación con inositol 2-monofosfato (2mM) durante 7 minutos. En el tratamiento con NaCl la células fueron tratadas con vehículo o ACTH durante 2 minutos, luego se agregó el NaCl para obtener una concentración final de 2 M y se continuó la incubación durante 5 minutos más. Después de los tratamientos se midió la fosfatasa alcalina (FAL) (ver métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E.S. de tres determinaciones. * Significativamente diferente del control solo, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH solo $p < 0,05$. (ANOVA)

Tratamiento	Actividad de FAL (unidades/ 0,1 ml de sobrenedante)
Vehículo	0.260 \pm 0.020
ACTH	0.362 \pm 0.009 *
Vehículo + Inositol 2-monofosfato	0.335 \pm 0.004
ACTH + Inositol 2-monofosfato	0.550 \pm 0.010 **
Vehículo + NaCl	0.360 \pm 0.008
ACTH + NaCl	0.670 \pm 0.010 **

Con la idea de analizar el efecto del tratamiento con NaCl 2 M sobre la cantidad de fosfatasa alcalina presente en el medio extracelular, se trataron células primero con vehículo o ACTH por 2 min, y luego, se agregó la sal por 5 minutos más. En resultados previos, habíamos visto que ACTH es capaz de incrementar la liberación de fosfatasa alcalina después de 2 minutos de tratamiento (Vaena de Avalos, 1998). Luego, de incrementar la liberación de la enzima por tratamiento con la hormona, se agregó la sal para bloquear la interacción de la enzima liberada con los receptores de IPG.

A pesar que el tratamiento con NaCl puede provocar daño celular, el cual puede causar la liberación de enzimas conteniendo GPI o aumentar la accesibilidad de fosfatasa alcalina a proteasas o fosfolipasas, estos efectos de la sal están presentes tanto en células controles como tratadas con ACTH. Sin embargo, el incremento en la liberación de fosfatasa alcalina provocado por el tratamiento con NaCl en células controles fue menor que el observado en células tratadas con ACTH, sugiriendo que una mayor cantidad de enzima interactúa con el receptor de IPG en presencia de ACTH.

Como hemos visto anteriormente, se obtuvieron datos similares con el inositol 2-monofosfato, lo que indicaría que ACTH estimula la incorporación de IPG en células adrenocorticales.

3.2.2 Participación de AMPc en la liberación de FAL por ACTH

Como se ha comentado, el AMPc ha sido descrito como mediador intracelular de la acción de un gran número de hormonas, entre ellas, ACTH.

Se quiso investigar si el AMPc media la liberación de fosfatasa alcalina por la hormona. Estudiamos el efecto de un análogo permeable del AMPc, el dibutilil AMPc (db-AMPc) y encontramos que el db-AMPc incrementa la liberación de la enzima (Tabla 8). Además, U73122 fue capaz de bloquear este efecto del db-AMPc (Tabla 8), sugiriendo que la activación de fosfolipasa C es posterior a la producción de AMPc.

3.2.3 Participación de una proteína G en la liberación de FAL por ACTH

Las hormonas y los neurotransmisores regulan una gran variedad de funciones fisiológicas y de condiciones patológicas. En varios casos la señal es traducida al interior de la célula por acoplamiento del receptor a proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Por unión de la hormona al receptor se produce la activación del receptor y su interacción con la proteína G, disociándose la subunidad α de la proteína G, por un lado y el dímero $\beta\gamma$, por otro.

Existen distintas familias de subunidades α agrupadas en base a homología y función: por ejemplo, α_s estimula adenililciclase produciendo un aumento de la concentración de AMPc intracelular; α_i inhibe adenililciclase y α_q se acopla a fosfolipasa C del subtipo β produciendo un aumento de la concentración intracelular de Ca.

Existen distintas herramientas para analizar la participación de una proteína G en una determinada respuesta. Por ejemplo, la toxina de pertussis inhibe la respuesta vía G_i/o porque produce el desacople de aquellos receptores que interactúan con las proteínas G_i o G_o por ADP-ribosilación de la subunidad $\alpha_{i/o}$ en un residuo cisteína del dominio conservado carboxi-terminal, por lo que esta toxina es utilizada para investigar si estas proteínas G están involucradas en una respuesta.

Es sabido que una hormona, la insulina, activa una fosfolipasa C que hidroliza GPI y se propone que esta activación es mediada por una proteína G sensible a toxina de pertussis (Luttrell, 1988; Vila., 1990).

Como se vio ACTH estimula una fosfolipasa C de GPI y provoca la rápida liberación al medio extracelular de fosfatasa alcalina, enzima anclada por GPI.

Por eso, se estudió el efecto del pretratamiento con la toxina de pertussis sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH (Tabla 10). Encontramos que la toxina de pertussis inhibió significativamente tanto la liberación de la enzima mediada por db-AMPc como la liberación de la enzima mediada por ACTH. Dado que esta toxina es capaz de inhibir la respuesta mediada tanto por G_i o por G_o , este resultado indica que proteínas G_i o G_o están involucradas en esta acción de ACTH y que la activación de G_i/o es posterior a la producción de APMc.

Tabla 10. Efecto del pretratamiento con toxina de pertussis sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH o AMPc en células adrenocorticales de rata. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con vehículo o toxina de pertussis (10 µg/ml) durante 1 hora previamente a la estimulación con vehículo (control), ACTH (1 nM) o db-AMPc (1 mM) durante 7 min Después de los tratamientos se midió la fosfatasa alcalina (FAL) (ver métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E.S. de tres determinaciones * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$; # Significativamente diferente de db-AMPc $p < 0,05$.

Pretratamiento	Tratamiento	Actividad de FAL (unidades/ 0,1 ml de sobrenadante)
Vehículo	Control	0,384 \pm 0,020
Vehículo	ACTH	0,540 \pm 0,010 *
Vehículo	db-AMPc	0,576 \pm 0,010 *
Toxina de pertussis	Control	0,349 \pm 0,017
Toxina de pertussis	ACTH	0,408 \pm 0,009 **
Toxina de pertussis	db-AMPc	0,422 \pm 0,027 #

Para investigar si Gi es la proteína G involucrada en esta acción de ACTH, probamos el efecto de anticuerpos que reconocen el dcapeptido C-terminal común de las subunidades α de Gi1 α y Gi2 α . Se informó que estos anticuerpos anti-Gi inhiben acciones mediadas por Gi (Mckenzie, 1988; Vila, 1990).

Distintos tratamientos permiten la permeabilización de células para facilitar la entrada de moléculas. Se ha visto que por el tratamiento de células con el detergente digitonina se perfora la membrana plasmática mientras no se afectan membranas internas como la membrana nuclear o del retículo endoplásmático (Takizawa, 1999), lo que posibilita la entrada de proteínas a la célula. Una vez permeabilizada la célula con digitonina, el tratamiento con una solución de proteína permite su entrada en la célula.

Teniendo esto en cuenta, se prepararon células adrenocorticales de rata y se trataron con digitonina como se describió anteriormente (Takizawa, 1999, Sakata, 1999), y después de lavar con medio de incubación para eliminar el detergente, se incubaron las células con anticuerpos anti-Gi o con IgG aislada de suero normal de conejo como control, durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se determinó la actividad de fosfatasa alcalina.

Encontramos que la permeabilización de células adrenocorticales con digitonina, seguida por el tratamiento con anticuerpos anti-Gi, inhibió significativamente el incremento en la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH mientras que el tratamiento con IgG aislada de suero normal de conejo no modificó este efecto de la hormona (Tabla 11). Estos resultados indican que una proteína Gi está involucrada en la liberación de fosfatasa alcalina por ACTH.

Con el fin de confirmar la presencia de proteínas Gi en nuestras preparaciones de células adrenocorticales de rata, se realizó un western-blot utilizando como primer anticuerpo al mismo anticuerpo anti-Gi utilizado en los experimentos anteriores.

La presencia de Gi en nuestra preparación celular se confirmó por la aparición de 2 bandas de 40 y 41 KDa en el Western-blot (Figura 17).

En un trabajo anterior donde se utilizaron estos anticuerpos, se obtuvo este mismo patrón de bandas (Strasshein, 1990) que corresponden a Gi1 α (41KDa) y Gi2 α (40 KDa), pues estos anticuerpos reconocen el dcapeptido C-terminal común de las subunidades α de Gi1 α y Gi2 α , como hemos señalado.

Tabla 11. Efecto de anticuerpos anti-Gi sobre la liberación de fosfatasa alcalina mediada por ACTH en células adrenocorticales de rata. Se permeabilizaron células adrenocorticales de rata con 40 µg/ml de digitonina durante 5 min a 0 °C como se describió anteriormente (Sakata, 1999) previamente a la incubación con anticuerpos anti-Gi, IgG de suero normal de conejo (IgG normal) o vehículo durante 30 min a 37 °C. Luego, se estimularon las células con vehículo o ACTH (1nM) durante 7 min. Después de los tratamientos se midió la fosfatasa alcalina (FAL) (ver métodos). * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$.

Pretratamiento	Tratamiento	Actividad de FAL(unidades/ 0.1 ml de sobrenadante)
Vehículo	Control	0,200 ± 0,010
Vehículo	ACTH	0,300 ± 0,015 *
Anti-Gi	ACTH	0,220 ± 0,010 **
IgG normal	ACTH	0,280 ± 0,015

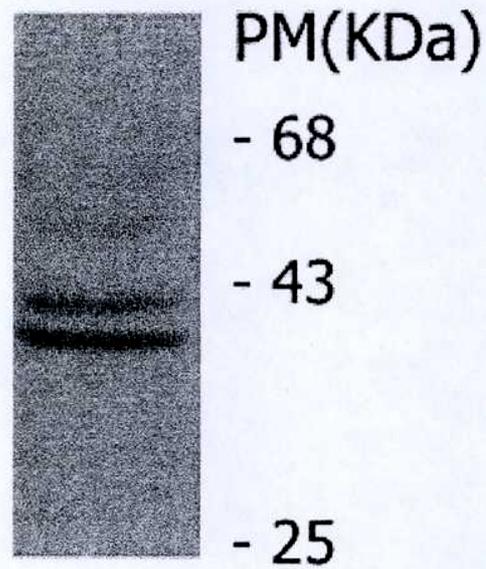


Fig. 17. Detección de Gi por western-blot. Se homogeneizaron células adrenocorticales de rata y después de centrifugar (500 g x 5 min.) se usó el sobrenadante para la electroforesis. Una alícuota (30 μ g de proteínas) se separó por SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa y se utilizó como primer anticuerpo anti-Gi como se describe en Métodos. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

3.2.4 Efecto de anticuerpos anti-inositolfosfoglicano y toxina de pertussis sobre la acumulación de esteroides producida por ACTH

Para estudiar aún más la participación de una proteína Gi sensible a toxina de pertussis en la acción de ACTH, evaluamos el efecto de esta toxina sobre la producción de esteroides.

Se observó que el pretratamiento con esta toxina no afecta la producción de esteroides en células controles pero provoca un incremento pequeño pero significativo en la acumulación de corticosterona mediada por ACTH (Figura 18), lo que concuerda con una disminución de IPG que resultaría de una inhibición de una GPI-fosfolipasa C activada a través de Gi.

Como puede verse también en la Figura 18, el tratamiento con ACTH en presencia de anti-CRD, provoca un notable aumento del contenido de corticosterona con respecto al tratamiento con la hormona solamente. Este incremento es mayor que el encontrado con la toxina de pertussis.

En cuanto al tratamiento con ACTH en presencia tanto de toxina de pertussis como de anti-CRD, no parece haber efectos aditivos o sinérgicos con respecto al tratamiento con la hormona en presencia de cada agente por separado (Figura 18), lo que indicaría que tanto la toxina de pertussis como el anti-CRD participan del mismo camino. Esto sugiere que ambos actúan a través de IPG.

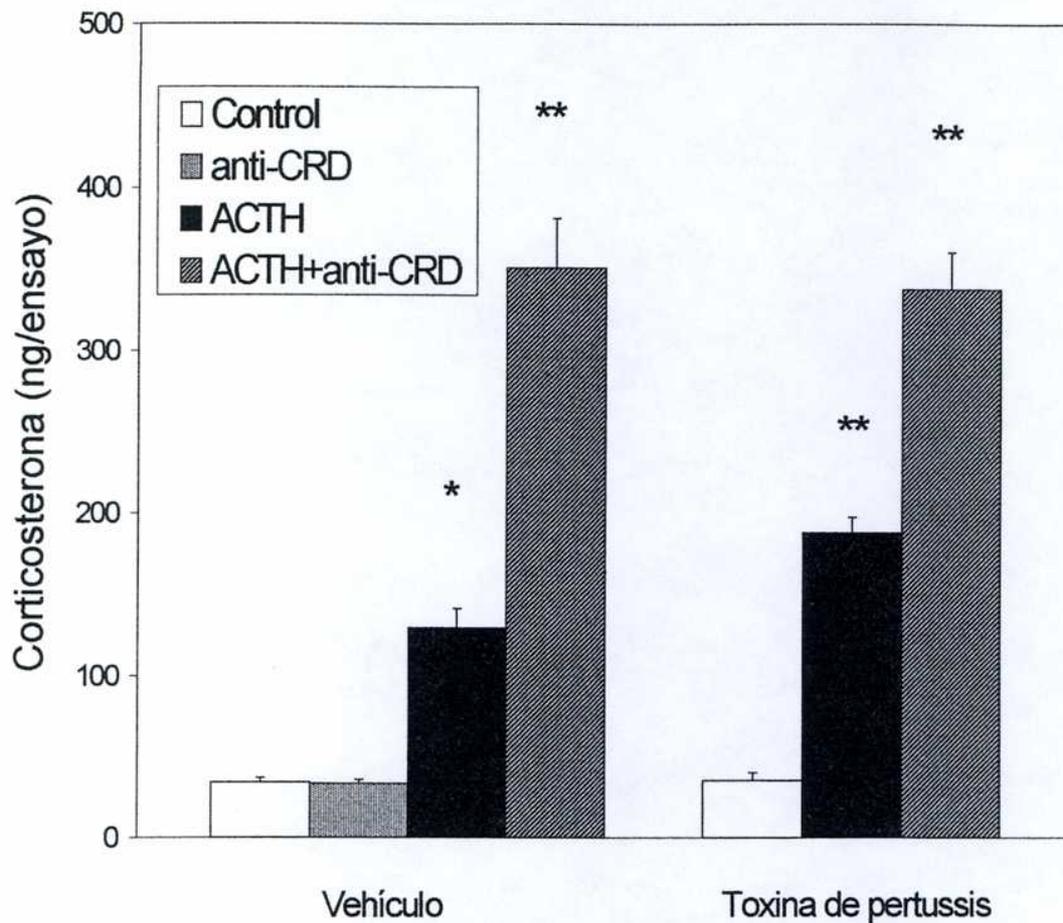


Figura 18. Efecto de la toxina de pertussis y anti-CRD sobre la acumulación de corticosterona mediada por ACTH. Se preincubaron células adrenocorticales de rata con vehículo o con toxina de pertussis (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h previamente a la estimulación con vehículo (control), anti-CRD 17 $\mu\text{g/ml}$, ACTH 1 nM, ACTH 1 nM + anti-CRD 17 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h más. Después de los tratamientos se midió corticosterona por RIA (ver métodos). Los resultados expresan el promedio \pm E.S. de tres determinaciones * Significativamente diferente del control, $p < 0,05$; ** Significativamente diferente de ACTH $p < 0,05$.

Por otro lado, el pretratamiento de células adrenocorticales con el inhibidor de fosfolipasa C, U73122, provocó un efecto sobre la acción de ACTH similar al obtenido con toxina de pertussis (Figura 16). Sin embargo, el incremento en la acumulación de esteroides producido por la toxina de pertussis o el U73122 fue menor que el encontrado con anti-CRD, lo que indicaría que sólo una parte del IPG que inhibe la respuesta de ACTH se pierde al bloquear la activación de fosfolipasa C por Gi.

Por lo tanto, la disminución en la producción de IPG obtenida por inhibición de GPI-fosfolipasa C, no aumentó la acción de ACTH tanto como lo hizo anti-CRD, que es capaz de bloquear la entrada del IPG a la célula.

Dado que, de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos con inhibidores de la entrada de IPG (Sección 3.2.1.3), ACTH es capaz de aumentar la entrada de IPG en la célula, es probable que este efecto de la hormona es el que contribuye principalmente a incrementar la disponibilidad de IPG en la célula bajo estas condiciones (tratamiento de células adrenocorticales con ACTH por una hora).

DISCUSSION

CAPITULO 4. DISCUSION

4.1 Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides en corteza adrenal

En una primera parte de este trabajo, se quiso investigar si existe alguna interrelación entre la síntesis de esteroides y la de hemo debido a la participación de citocromos, que son hemoproteínas, en la síntesis de esteroides.

Se encontró que en homogenato de adrenales de rata la biosíntesis de aldosterona, principal mineralocorticoide, y corticosterona, principal glucocorticoide en la rata, es estimulada por agregado de hemina.

Por otro lado, la administración de hemina a ratas por infusión también incrementó el contenido de aldosterona y corticosterona en la glándula adrenal.

Asimismo, como se había visto que DDC era capaz de bloquear la inducción de esteroides por ACTH en células adrenocorticales de ternero en cultivo y este efecto era revertido por el agregado de hemina, se quiso evaluar si DDC era capaz de bloquear la síntesis de hemo en adrenal como lo hace en el hígado. Para ello se trataron ratas con DDC y se evaluó el camino biosintético del hemo tanto en adrenal como en hígado.

Se encontró que DDC es capaz de bloquear la enzima que sintetiza hemo a partir de hierro y protoporfirina IX, la ferroquelatasa, en adrenal similarmente a lo que ocurre en hígado.

Esta inhibición produce un descenso en los niveles de hemo que se manifiesta con un aumento de la actividad de Ala-s en adrenal y también con una acumulación de protoporfirina IX. Es decir, que de acuerdo a nuestros resultados DDC tiene un efecto inhibitorio de la síntesis de hemo en adrenal similar al que fue descrito en el hígado.

En concordancia con esta propuesta, encontramos que el tratamiento de ratas con DDC no afecta la producción basal de esteroides pero inhibe la acumulación de esteroides producida por ACTH y que esta inhibición es revertida parcialmente por tratamiento de las ratas con hemina. Por lo tanto, la

disponibilidad de hemo afecta la estimulación de la síntesis de esteroides en adrenal.

Por otro lado, se quiso ver si un conocido inductor de citocromos P 450 hepáticos, el fenobarbital, que se sabe estimula la síntesis de hemo en hígado por inducción de la enzima reguladora de su síntesis, el ALA-s, también era capaz de afectar la síntesis de hemo y esteroides en adrenal.

Encontramos que el tratamiento de ratas con fenobarbital (60mg/kg administrados 24 y 48hs antes de matarlas) produjo un aumento de la actividad de ALA-s en hígado, pero no pudimos detectar aumento de la actividad de ALA-s en adrenal.

Sin embargo, encontramos aumento del contenido de corticosterona y aldosterona en la glándula por tratamiento con fenobarbital. Esto sugiere que podría haber una estimulación de ALA-s en adrenal aunque no fue detectada. En favor de esta idea, se ha propuesto que fenobarbital es capaz de activar el promotor de ALA-s hepática (Varone, 1999; Podvinec, 2004) que es el mismo que se expresa en adrenal.

En realidad, se ha descrito que tanto fenobarbital como distintos xenobioticos, son capaces de inducir el gen de citocromos hepáticos metabolizantes de drogas y el gen de ALA-s, este último permite proveer suficiente hemo para los apocitocromos formados. La inducción de ambos genes parece ocurrir por medio de una activación directa de la transcripción a través de secuencias que responden a estas drogas y que interaccionan con receptores nucleares huérfanos, "orphan nuclear receptors" (Podvinec, 2004; Wei, 2000).

Teniendo esto en cuenta, es probable que FB estimule la síntesis de ALA-s en adrenal lo que permitiría convertir los apocitocromos esteroideos en holoenzimas. De hecho, cabe destacar que la síntesis de esteroides aumenta aproximadamente al doble por tratamiento con fenobarbital, lo que sugiere que un 50% de los apocitocromos están libres en el estado basal en la adrenal de la rata, porcentaje que coincide con la estimación hecha a partir de la adición de hemina a homogenatos o la administración de hemina a ratas *in vivo*. Esto también refuerza la idea que FB está estimulando la síntesis de esteroides en adrenal a través de

un aumento de la síntesis de hemo con la consecuente conversión de apocitocromos en sus formas activas.

Por otro lado, en este trabajo se encontró que ACTH, un activador de la biosíntesis de esteroides en adrenal, es capaz de estimular rápidamente la síntesis del mRNA de ALA-s y esto está acompañado por un aumento en la actividad enzimática.

ALA-s es la enzima de velocidad limitante y la primera en la biosíntesis de hemo y todo los activadores de esta enzima, descriptos hasta el presente, inducen la enzima (De Matteis, 1988; Marks, 1988; Srivastava, 1988), como también sucede con ACTH.

El rol regulatorio de ALA-s en esta biosíntesis esta avalado por el hecho que el mRNA de esta enzima esta incrementado en condiciones fisiológicas de aumento de la demanda de hemo mientras que los niveles de expresión de las otras enzimas del camino no cambian significativamente (May, 1995).

En concordancia con nuestros resultados, se ha visto que el tratamiento de ratas con ACTH una vez al día durante tres días produce un aumento de la actividad de ALA-s en adrenal (Condie, 1976) y que dexametasona, un inhibidor de la liberación de ACTH, disminuye el mRNA de ALA-s en adrenal (Srivastava, 1992).

Dado que ACTH utiliza AMPc como segundo mensajero y que se ha informado que AMPc es capaz de mediar la activación del promotor de ALA-s (Varone, 1999), es posible que este mecanismo sea responsable del efecto de esta hormona sobre este mRNA.

En este trabajo también se encontró que endotelina, un estimulador de la síntesis de aldosterona, incrementa el mRNA de ALA-s.

La inducción de ALA-s en adrenal ocurrió rápidamente, después del tratamiento de ratas con ACTH o endotelina por una hora, cuando la síntesis de esteroides estaba aumentada pero no se detectaba incremento en el mRNA de CYP 21.

Se ha informado que ACTH induce CYP 21 después de tratamientos crónicos (John, 1986) y que ratas hipofisectomizadas por 72 hs que tienen una

menor cantidad de mRNA de SCC y CYP 21 en adrenal, al ser tratadas con ACTH se estimula significativamente el mRNA de CYP 21 después de 12hs mientras que SCC se incrementó después de 3hs de tratamiento con la hormona (Imai, 1990 b).

En nuestros experimentos, las ratas se infundieron con ACTH por una hora solamente. Este tratamiento con ACTH no incrementó el mRNA de CYP21 y probablemente el tiempo de tratamiento no fue suficientemente largo para la inducción de ningún citocromo. Si este fuera el caso, el incremento rápido de la síntesis de hemo produciría holoenzima a partir de apocitocromos pre-existentes como se informó previamente (Cozza, 1993).

A favor de esta idea, hemos encontrado, como señalamos anteriormente, que la mitad de los citocromos que participan de estas reacciones estarían en forma de apocitocromos en el estado basal en adrenales de rata. Una relación similar entre apo y holocitocromo se encontró con otro citocromo esteroidogénico, la estrógeno sintetasa en células de coriocarcinoma humano (Bellino, 1985).

Apoyando la propuesta que el tratamiento con inductores de la esteroidogénesis induce el ALA-s, en el laboratorio se ha visto que el tratamiento de ratas por 10 días con una dieta baja en sodio que estimula la síntesis de aldosterona, incrementa el mRNA de ALA-s en glomerulosa adrenal.

Además se ha informado que un estimulador de la síntesis de esteroides en testículo, la gonadotrofina coriónica humana (hcg) incrementa el mRNA de ALA-s en ese tejido (Srivastava, 1988).

Estimuladores de otros citocromos como: fenobarbital, conocido inductor de distintos citocromos P 450 en hígado (Srivastava, 1989) o la proteína de desacoplamiento (UCP-1) que estimula la proliferación mitocondrial y, por ende, los citocromos de la respiración (Li, 1999), también inducen ALA-s.

Es decir, tal cual ocurre con otros citocromos, los activadores de los citocromos esteroidogénicos en adrenal inducen ALA-s, lo que contribuiría a generar citocromos activos.

La estimulación aguda de la esteroidogénesis por hormonas tróficas requiere la síntesis de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR),

que entrega el colesterol a la membrana interna de la mitocondria, donde SCC convierte el colesterol en pregnenolona (Strauss, 1999).

La proteína StAR es estimulada por ACTH así como por hormonas gonadotróficas, por medio de AMPc y PKA (Strauss, 1999). Endotelina actúa por activación de fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilinositol-4,5- difosfato (PIP₂) liberando inositol e inositol 1,4,5-trifosfato (Woodcock, 1990). Aunque la inducción de StAR por endotelina en adrenal no se estudió, se sabe que angiotensina, que estimula la síntesis de aldosterona en la glomerulosa adrenal por hidrólisis de PIP₂, estimula la proteína StAR (Clark, 1999).

Teniendo esto en cuenta, podría ser que la inducción de StAR para asegurar la disponibilidad de colesterol en la mitocondria y la inducción de Ala-s para asegurar la disponibilidad de hemo, fueran los principales eventos que median el efecto agudo de los estimuladores de la biosíntesis de esteroides.

4.2 Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata

Se sabía que ACTH era capaz de hidrolizar GPI en células adrenocorticales de rata a través de una fosfolipasa C. En este trabajo hemos visto que ACTH incrementa la liberación de la enzima anclada por GPI, fosfatasa alcalina, en células adrenocorticales de rata por activación de una fosfolipasa C. Son varias las evidencias que apoyan la participación de una fosfolipasa C: a) la enzima liberada al medio extracelular aparece en la fase acuosa después de una partición en tritón X-114, b) U 73122 inhibe la liberación de esta enzima por la hormona y c) inositol 2-monofosfato y NaCl 2M incrementan la cantidad de enzima presente en el medio extracelular. Por lo tanto, es posible que una (G)PI- fosfolipasa C presente en la membrana celular e inhibida por U 73122 sea responsable de la liberación de la enzima.

La participación de una fosfolipasa C presente en la membrana celular en la hidrólisis de proteínas ancladas a la membrana externa por GPI esta de acuerdo

con los resultados que han sido observados en diferentes tipos de células en cultivo donde las proteínas ancladas por GPI son liberadas de la superficie celular por una fosfolipasa C endógena activada espontáneamente (Park, 2001) o por agentes como insulina (Movahedi, 1997) o interferón gamma y lipopolisacárido (Han, 1994). Además, se informó la existencia de una PI-fosfolipasa C en la superficie celular (ecto PLC) (Miscia, 1998) aunque aún no está clara la relación de esta PI-fosfolipasa C con la que está ubicada en la cara citosólica de la membrana celular.

En este trabajo, también encontramos que ACTH estimula la liberación de fosfatasa alcalina a través de AMPc y Gi. En concordancia, se ha propuesto que insulina aumenta la liberación de fosfatasa alcalina por activación de una fosfolipasa C que hidroliza GPI (Romero, 1988; Roberts, 1990) y se informó que una Gi está involucrada en la activación de esta fosfolipasa C (Luttrell, 1988; Vila, 1990).

Nuestros resultados indican que AMPc media la activación de Gi y fosfolipasa C porque tanto la toxina de pertussis como U 73122 inhiben la liberación de fosfatasa alcalina por db-AMPc.

Resulta interesante destacar que la participación de Gi en la respuesta de ACTH en la glándula adrenal humana fue recientemente informada (Cote, 2001).

En los últimos años se han descrito distintos receptores que son capaces de acoplarse a Gs y a Gi y se encontró que AMPc y proteína quinasa A median el cambio de Gs a Gi de estos receptores (Daaka, 1997; Soeder, 1999; Luo, 1999). En particular en el caso de los receptores adrenérgicos β_2 y β_3 , se encontró que la respuesta mediada por Gi inhibe la respuesta activada por Gs (Daaka, 1997; Soeder, 1999). Esto coincide con nuestros resultados, pues ACTH activa la síntesis de esteroides por activación de adenilato ciclasa a través de Gs y la activación por Gi de una fosfolipasa C que hidroliza GPI, contribuiría a la formación de IPG que es capaz de inhibir la acumulación de esteroides provocada por ACTH.

Apoyando esta propuesta, en trabajos previos, habíamos visto que la adición de anticuerpos anti-CRD al medio extracelular de células adrenocorticales

tratadas con ACTH, incrementa la acumulación de corticosterona. Este resultado indica que IPG esta presente en el medio extracelular de células tratadas con ACTH y es un inhibidor fisiológico de la acción de ACTH y es consistente con nuestros resultados previos que indican que un IPG obtenido de *Trypanosoma cruzi*, inhibe la respuesta de ACTH, lo que apoya aún más la participación de GPI en la acción de ACTH.

En este trabajo vimos que ACTH estimula la liberación de fosfatasa alcalina al medio extracelular por activación de una fosfolipasa C, la cual esta mediada por AMPc y Gi. Aunque la fosfatasa alcalina fue una herramienta útil para dilucidar el sistema de señales que participa en la activación de GPI-fosfolipasa C por ACTH, probablemente otras proteínas ancladas por GPI y GPI libres, también contribuyen a la producción total de IPG. Aunque también, de acuerdo a nuestros resultados, el decremento en la producción de IPG obtenido por inhibición de GPI-PLC, por toxina de pertussis o U73122, no incrementa la acumulación de corticosterona mediada por ACTH tanto como lo hace anti-CRD por bloqueo de la entrada de IPG a la célula.

Como hemos visto que ACTH es capaz de estimular la entrada de IPG en la célula parecería que este efecto de la hormona es el que está contribuyendo principalmente al incremento de la disponibilidad de IPG en las células en nuestras condiciones de ensayo.

Es decir que, de acuerdo a nuestros resultados el receptor de ACTH es capaz de acoplarse a Gi y que AMPc está involucrado en el pasaje del receptor de una proteína Gs a una Gi, y este acoplamiento a Gi media una señal de inhibición de la respuesta de ACTH.

CONCLUSIONES

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

5.1 Efecto de la disponibilidad de hemo sobre la síntesis de esteroides en corteza adrenal

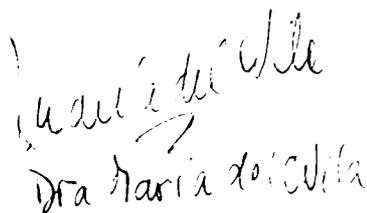
- Se encontró que la adición de hemina *in vitro* a homogenatos de adrenal o la administración de hemina a ratas *in vivo*, estimula la síntesis de esteroides.
- DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina, es capaz de inhibir la síntesis de hemo en adrenal similarmente a lo que ha sido descrito en hígado, por inhibición de la última enzima de esta biosíntesis, la ferroquelatasa. El bloqueo de la síntesis de hemo en adrenal con DDC produce una disminución de la acumulación de aldosterona y corticosterona producida por ACTH. Este efecto del DDC es parcialmente revertido por tratamiento de las ratas con hemina. Es decir que el contenido de hemo en adrenal es un factor limitante de la respuesta de un estimulador de la síntesis de esteroides en adrenal como ACTH.
- El fenobarbital, un conocido inductor de la síntesis de hemo, que estimula la transcripción de la enzima reguladora de esta biosíntesis el ALA-sintasa, actuando sobre el promotor de este gen que es el mismo que se expresa en adrenal, es capaz de estimular la síntesis de aldosterona y corticosterona en adrenales de rata.
- Estimuladores de la síntesis de esteroides en adrenal como ACTH y endotelina son capaces de aumentar el mRNA de ALA-sintasa, enzima de velocidad limitante en la síntesis de hemo, de modo de asegurar una suficiente provisión de hemo para transformar los apocitocromos libres, involucrados en la síntesis de esteroides, en holocitocromos activos. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado con estimuladores de otros citocromos como los respiratorios o los metabolizantes de drogas en microsomas hepáticos, que también estimulan ALA-sintasa.

Es decir que la disponibilidad de hemo afecta la síntesis de esteroides y los estimuladores de la síntesis de esteroides aumentan el mRNA de ALA-sintasa para asegurar esta disponibilidad.

5.2 Participación de glicosilfosfatidilinositol en la respuesta de ACTH en corteza adrenal de rata

- Se encontró que la liberación producida por ACTH de una enzima anclada a la superficie celular por GPI, la fosfatasa alcalina, esta mediada por una fosfolipasa C que hidroliza GPI.
- ACTH a través de AMPc activa una Gi que es necesaria para la activación de la fosfolipasa C de GPI.

Es decir, que el receptor de ACTH, como ha sido descripto para otros receptores acoplados a Gs que estimulan la producción de AMPc, es capaz de producir un posterior acoplamiento a Gi mediado por AMPc. Este acoplamiento a Gi media la activación de una fosfolipasa C de GPI lo que produce IPG que, como se había visto, es capaz de inhibir la respuesta de la hormona. Por lo tanto, la respuesta de ACTH se inicia con un acoplamiento a Gs y posteriormente se produce un acoplamiento a Gi, lo que mediaría una señal de apagado de la respuesta.


Dra. María Dolores


Claudia N. Martini

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Ades I. Z. (1990) Heme production in animal tissues: the regulation of biogenesis of delta-aminolevulinic synthase. *Int. J. Biochem.* 22:565-578.

Alvarez J., Sanchez-Arias J., Guadaño A., Estevez F., Varela I., Feliu J., Mato J. (1991) Transport in isolated rat hepatocytes of the phospho-oligosaccharide that mimics insulin action. Effects of adrenalectomy and glucocorticoid treatment. *Biochem. J.* 274: 369-374.

Andreis P. G., Tortorella C., Malendowicz L. K., Nussdorfer G. G. (2001) Endothelins stimulate aldosterone secretion from dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells, acting through ETB receptors coupled with the phospholipase C-dependent signalling pathway. *Peptides.* 22:117-22

Andreis P. G., Neri G., Tortorella C., Aragona F., Rossi G. P., Nussdorfer G. G. (2002) Mechanisms transducing the aldosterone secretagogue signal of endothelins in the human adrenal cortex. *Peptides.* 23:561-566.

Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S. (1991) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348:730-732.

Arakane F., King S., Du I., Kallen C., Walsh L., Watari H., Stocco D. Strauss J. (1997) Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272: 32656-32662

Artemenko I. P., Zhao D., Hales D. B., Hales K. H., Jefcoate C. R. (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 276:46583-96.

Barrett P. Q., Bollag W. B., Isales C. M., McCarthy R. T., Rasmussen H. (1989) Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr. Rev.* 10:496-518.

Bellino F. L., Hussa R. O. (1985) Estrogen synthetase stimulation by hemin in human carcinoma cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:232-238.

Belloni A. S., Rossi G. P., Andreis P. C., Neri G., Albertin G., Pessina A. C., Nussdorfer G. G. (1996) Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension.* 27:1153-1159.

Belloni A. S., Rossi G. P., Zanin L., Prayer-Galetti T., Pessina A. C., Nussdorfer G. G. (1994). In vitro autoradiographic demonstration of endothelin-1 bindings sites in the human adrenal cortex. *Biomed. Res.* 15:95-99.

Benghezal M., Benachour A., Rusconi S., Aebi M., Conzelman A. (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.* 15:6575-6583.

Bertello L. E., Andrews N. W., de Lederkremer R. M. (1996) Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79:143-151.

Bessler M., Mason P. J., Hillmen P., Miyata T., Yamada N., Takeda J., Luzzatto L., Kinoshita T. (1994) Paroxysmal nocturna haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J.* 13:110-117.

Bishop D. F., Henderson A. S., Astrin K. H. (1990) Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics.* 7:207-14.

Bogdanowicz P, Pujol J. (2000) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) hydrolysis by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) as a potential early step in the inhibition of epithelial cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 208: 143-150.

Bordier C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256:1604-1607.

Boudot C., Kadri Z., Petitfrere E., Lambert E., Chretien S., Mayeux P., Haye B., Billat C. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates glycosylphosphatidylinositol hydrolysis through PLC-gamma(2) activation in erythropoietin-stimulated cells. *Cell. Signal.* 14:869-878.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-251.

Brenner D. A., Joseph R. B. (1980) A fluorometric assay for measurement of protoporphyrinogen oxidase activity in mammalian tissue. *Clin. Chim. Acta.* 100:259-266.

Brewis I. A., Ferguson M. A., Mehlert A., Turner A. J., Hooper, N. M. (1995) Structures of the glycosyl-phosphatidylinositol anchors of porcine and human renal membrane dipeptidase. Comprehensive structural studies on the porcine anchor and interspecies comparison of the glycan core structures. *J. Biol. Chem.* 270:22946-22956.

Bulow R., Overath, P. (1985) Synthesis of a hydrolase for the membrane-form variant surface glycoprotein is repressed during transformation of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 187:105-110.

Butikofer P., Kuypers F. A., Shackleton C., Brodbeck U., Stieger, S. (1990) Molecular species analysis of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 265:18983-18987.

Butikofer P., Boschung M., Brodbeck U., Menon., A. (1996) Phosphatidylinositol hydrolysis by *Trypanosoma brucei* glycosylphosphatidylinositol phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 271:15533-15541.

Caron K., Ykeda I., Soo S. C., Stocco D., Parker K., Clark B. (1997) Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Endocrinol.* 11: 138-147.

Carrington M., Bulow R., Reinke H., Overath P. (1989) Sequence and expression of the glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:289-296.

Chen R., Walter E. I., Parker G., Lapurga J. P., Millan J. L., Ikehara Y., Udenfriend S., Medof, M. E. (1998) Mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor transfer to proteins and posttransfer deacylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9512-9517.

Cherradi N., Rossier M. F., Valloton M. B., Timberg R., Friedberg I., Orly J., Wang X. J., Stocco D. M., Capponi A. M. (1997) Submitochondrial distribution of three steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450 scc and 3 β -hydroxysteroid deshydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7899-7907.

Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201:134-139.

Chung B-C, Guo I-C, Chou S-J (1997) Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids.* 62:37-42.

Clark B. J., Wells J., King S. R., Stocco D. M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.* 269:28314-22.

Clark B. J., Soo S. C., Caron K. M., Ikeda I., Parker K., Stocco D. M. (1995) Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Endocrinol.* 9:1346-1355.

Clark B. J., Combs R. (1999) Angiotensin II and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate induce human steroidogenic acute regulatory protein transcription through a common steroidogenic factor-1 element. *Endocrinology* 140: 4390-4398.

- Clark I. A., Chaudri G., Cowden W. B. (1989) Roles of tumor necrosis factor in the illness and pathology of malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:436–440.
- Cole S. P. C., Marks G. S. (1984) Ferrochelatase and N-alkylated porphyrins. *Mol. Cell. Biochem.* 64:127-137.
- Compagnone N. A., Bulfone A., Rubenstein J. L., Mellon S. H. (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology.* 136:2689–2696
- Condie L. W., Tephly T. R., Baron J. (1976) Studies on heme synthesis in the rat adrenal. *Annals of Clinical Research.* 8: 83-88.
- Cooke B. A., Janszen F. H. A., Clotscher W. F., Van der Molen H. J. (1975) Effect of protein-synthesis inhibitors on testosterone production in rat testis interstitial tissue and Leydig-cell preparations. *Biochem. J.* 150:423-418.
- Cote M., Guillon G., Payet M., Gallo-Payet N. (2001) Expression and regulation of adenylyl cyclase isoforms in the human adrenal gland. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* 86: 4495-4503.
- Cotter P. D., Willard H. F., Gorski J. L, Bishop D. F. (1992) Assignment of human erythroid delta-aminolevulinate synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X; autosome translocations. *Genomics.* 13:211-212.
- Couto A. S., de Lederkremer R. M., Colli W., Alves M. J. (1993) The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic-labeling and structural studies. *Eur. J. Biochem.* 217:597-602.
- Cozza E. N., Vila M. C., Gomez-Sanchez C. E., Farese R. V. (1988). ACTH stimulates turnover of the phosphatidylinositol-glycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 585-589.
- Cozza E. N., Gomez-Sanchez C. E., Foecking M. F., Chiou S. (1989) Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* 84: 1032-1035.
- Cozza E. N., Vila M. C., Gomez-Sanchez C. E. (1993) Stimulation of aldosterone production by hemin in calf adrenal glomerulosa cell cultures. *Steroids.* 58:384-386.
- Crivello J. F., Jefcoate C. R. (1978) Mechanism of corticotropin action in rat adrenal cells. 1. Effect of inhibitor of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 542:315-329.

- Crivello J. F., Jefcoate C. R. (1980) Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 255: 8144-8151.
- Daaka Y, Luttrell L, Lefkowitz, L. (1997) Switching of the coupling of the α_2 -adrenergic receptor to different G-proteins by protein Kinase A. *Nature.* 390: 88-91.
- Dailey H. A., Finnegan M. G., Johnson M. K. (1994) Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. *Biochemistry.* 33: 403-407.
- Davitz M. A., Hom J., Schenkman, S. (1989) Purification of a glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J. Biol. Chem.* 264:13760-13764.
- Deeg M.A., Humphrey D.R., Yang S.H., Ferguson T.R., Reinhold V.N., Rosenberry T.L. (1992) Glycan components in the glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Novel fragments produced by trifluoroacetic acid. *J. Biol. Chem.* 267:18573-18580.
- Deeg M. A., Brass E. P., Rosenberry T. L. (1993) Inositolglycan phosphate derived from human erythrocyte acetylcholinesterase glycolipid anchor and inositol cyclic 1,2-phosphate antagonize glucagon activation of glycogen phosphorylase. *Diabetes.* 42:1318-1323.
- Deeg M. .A., M.A. Davitz M. A. (1995). Glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D: a tool for glycosylphosphatidylinositol structural analysis. *Methods. Enzymol.* 250:630-640.
- DeLuca A., Rush J. S., Lehrman M. A., Waechter, C. J. (1994) Mannolipid donor specificity of glycosylphosphatidylinositol mannosyltransferase-I (GPIMT-I) determined with an assay system utilizing mutant CHO-K1 cells. *Glycobiology.* 4: 909-915.
- De Matteis F, Abbritti G, Gibbs A (1973) Decreased liver activity of porphyrin-metal chelatase in hepatic porphyria caused by 3,5-diethoxycabonyl-1,4-dihydrocollidine. *Biochem. J.* 134:717-727.
- De Matteis F. (1988) Toxicological aspects of liver heme biosynthesis. *Seminars in Hematology.* 25:321-329.
- De Matteis F., Marks GS (1996) Cytochrome P450 and its interaction with the heme biosynthetic pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1-8.
- Doering T. L., Masterson W. J., Englund, P. T., Hart, G. W. (1989) Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J. Biol. Chem.* 264: 11168-11173.

Dwarki V. J., Francis V. N. K., Bhat G.J., Padmanaban G. (1987) Regulation of Cytochrome P-450 Messenger RNA and Apoprotein Levels by Heme. *J. Biol. Chem.* 262:16958-16962.

Fanica-Gaignier M., Clement-Metral J. (1973) 5-Aminolevulinic-acid synthetase of *Rhodospseudomonas spheroides* Y. Kinetic mechanism and inhibition by ATP. *Eur. J. Biochem.* 40:19-24.

Fankhauser C., Homans S. W., Thomas-Oates J. E., McConville M. J., Desponds C., Conzelmann A., Ferguson M. A. (1993) Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268:26365-26374.

Farese R. V., Prudente W. J. (1977) On the requirement for protein synthesis during corticotropin-induced stimulation of cholesterol side chain cleavage in rat adrenal mitochondrial and solubilized desmolase preparations. *Biochem. Biophys. Acta.* 496:567-570.

Ferguson J. J. (1962) Puromycin and adrenal responsiveness to adrenocorticotropin hormone. *Biochem. Biophys. Acta.* 57:616-617.

Ferguson J. J. (1963) Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J. Biol. Chem.* 238:2754-2759.

Ferguson M. A., Low M. G., Cross G. A. (1985) Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 260:14547-14555.

Ferguson M. A., Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W. (1988 a). Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science.* 239:753-759.

Ferguson M. A. J., Williams A. F. (1988 b) Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285-320.

Ferguson M. A. (1992). Site of palmitoylation of a phospholipase C-resistant glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.* 284:297-300.

Ferguson M. A. J. (1994) What can GPI do for you? *Parasitol. Today.* 10:48-52.

Ferguson M. A. J., Brimacombe J. S., Brown J. R., Crossman A., Dix A., Field R. A., Günther M. L., Milne K. G., Sharma D. K., Smith T. K. (1999 a) The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455:327-340.

Ferguson M. A. (1999 b) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors and the contributions of trypanosome research. *J. Cell. Sci.* 112:2799–2809.

Ferreira G. C., Franco R., Lloyd S. G., Pereira A. S., Moura I., Moura J. J. G., Huynh B. H. (1994) Mammalian ferrochelatase: a new addition to the metalloenzyme family. *J. Biol. Chem.* 269: 7062–7065.

Ferreira G. C., Franco R., Lloyd S. G., Moura I., Moura J. J. G., Huynh B. H. (1995 a) Structure and function of ferrochelatase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27: 221–229.

Ferreira G. C., Gong J. (1995 b) 5-Aminolevulinate synthase and the first step of heme biosynthesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:151-159.

Field M.C., Menon A. K., Cross G.A. (1991) A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*: lipid structure and biosynthesis. *EMBO J.* 10:2731-2739.

Field M. C. (1997) Is there evidence for phospho-oligosaccharides as insulin mediators? *Glycobiology.* 7:161–168.

Finkelstein C. V., Maloberti P., Mendez C. F., Paz C., Comejo Maciel F., Cymeryng C. B., Neuman I., Dada L., Mele P. G., Solano A. R., Podestá A. R. (1998) An adrenocorticotropin-regulated phosphoprotein intermediary in steroid synthesis is similar to an acyl-CoA thioesterase enzyme. *Eur. J. Biochem.* 256: 60–66.

Foran S. E., Abel G. (2003) Guide to porphyrias. A historical and clinical perspective. *Am. J. Clin. Pathol.* 119:86-93.

Fox J. A., Duszenko M., Ferguson M. A., Low M. G., Cross G. A. (1986). Purification and characterization of a novel glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 261:15767-15771.

Fox J.A., Soliz N. M., Saltiel A. R. (1987). Purification of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase C from liver plasma membranes: a possible target of insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:2663-2667.

Fraering P., Imhof I., Meyer U., Strub J. M., van Dorsselaer A., Vionnet, C., Conzelmann, A. (2001) The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol. Biol. Cell.* 12:3295-306.

Fraser R., Brown J. J., Lever A. F., Magan P. A., Robertson J. I. S. (1979) Control of aldosterone secretion. *Clin. Sci. (Lond)* 59:389-399.

- Frick W., Bauer A., Bauer J., Wied S., Muller G. (1998) Insulin-mimetic signalling of synthetic phospho-inositolglycans in isolated rat adipocytes. *Biochem. J.* 336:163-181.
- Garren L. D., Ney R. L., Davis W. W. (1965) Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by ACTH in vivo. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 53:1443-1450.
- Garren L. D., Davis W. W., Crocco R. M. (1966) Puromycin analogs: action of adrenocorticotrophic hormone and the role of glycogen. *Science.* 152: 1386-1388.
- Gelb M. H., Jain M. K., Berg O. G. (1994) Inhibition of phospholipase A2.. *FASEB J.* 8:916-924.
- Ghahremani M. H., Cheng P., Lembo P. M., Albert P. R. (1999) Distinct roles for Galphai2, Galphai3, and Gbeta gamma in modulation of forskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptors. *J. Biol. Chem.* 274:9238-9245.
- Gomez-Sanchez C. E., Murry B. A., Ken D. C., Kaplan N. M. (1975) A direct radioimmunoassay of serum corticosterone in the rat. *Endocrinology.* 96:796-781.
- Gomez-Sanchez C. E., Foecking M. F., Ferris M. W., Chavarri M. R., Uribe L., Gomez-Sanchez E. P. (1987) The production of monoclonal antibodies against aldosterone. *Steroids.* 49:581-587.
- Grau G. E., Fajardo L. F., Piguet P. F., Allet B., Lambert P. H., Vassalli P. (1987) Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 237: 1210-1212.
- Guo I-C, Huang C, Chung B-c. (1993) Differential regulation of the CYP11A1 (P450_{scc}) and ferredoxin genes in adrenal and placental cells. *DNA Cell. Biol.* 12:849-860.
- Guther M. L., de Almeida M. L., Yoshida N., Ferguson M. A. (1992) Structural studies on the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. The structure of the glycan core. *J. Biol. Chem.* 267:6820-6828.
- Guther M. L., de Almeida M. L., Rosenberry T. L., Ferguson M. A. (1994) The detection of phospholipase-resistant and -sensitive glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors by western blotting. *Anal. Biochem.* 219:249-255.
- Hall P. F. (1984). Steroidogenic cytochromes P 450: do the properties of the homogeneous enzymes reveal important aspects of the regulation of steroid synthesis in vivo. *Endocr. Res.* 10:311-317.

- Hamburger D., Egerton M., Riezman, H. (1995) Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J. Cell. Biol.* 129:629-639.
- Hamilton J. W., Bement J., Sinclair P. R., Sinclair J. F., Wetterhahn K. E. (1988) Expression of 5-aminolaevulinate synthase and cytochrome P-450 mRNA in chicken embryo hepatocytes *in vivo* and culture. *Biochem. J.* 255:267-275.
- Han M., Yim C., An N., Kim H., Kim U. (1994) Glycosylphosphatidylinositol-anchored NAD glycohydrolase is released from peritoneal macrophages activated by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 56: 792-796.
- Hari T., Kunze H., Bohn E., Brodbeck U., Butikofer P. (1996) Subcellular distribution of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in rat liver. *Biochem. J.* 320:315-319.
- Hayashi N., Watanabe N., Kikuchi, G. (1983) Inhibition by hemin of *in vitro* translocation of chicken liver delta-aminolevulinate synthase into mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115:700-706.
- Haynes P. A., Gooley A. A., Ferguson M. A., Redmond J. W., Williams K. L. (1993) Post-translational modifications of the *Dictyostelium discoideum* glycoprotein PsA. Glycosylphosphatidylinositol membrane anchor and composition of O-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* 216:729-737.
- Heise N., de Almeida M. L., Ferguson M. A. (1995) Characterization of the lipid moiety of the glycosylphosphatidylinositol anchor of *Trypanosoma cruzi* 1G7-antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70:71-84.
- Higashi Y., Yoshioka H., Yamane M., Gotoh O., Fujii-Kuriyama Y. (1986) Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:2841-5.
- Hiroi Y., Komuro I., Chen R., Hosoda T., Mizuno T., Kudoh S., Georgescu S. P., Medof M. E., Yazaki Y. (1998) Molecular cloning of human homolog of yeast GAA1 which is required for attachment of glycosylphosphatidylinositols to proteins. *FEBS Lett.* 421: 252-258.
- Hirose S., Ravi L., Hazra S. V., Medof M. E. (1991) Assembly and deacetylation of N-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3762-3766.
- Hirose S., Prince G. M., Sevelever D., Ravi L., Rosenberry T. L., Ueda E., Medof M. E. (1992) Characterization of putative glycoinositol phospholipid anchor precursors in mammalian cells. Localization of phosphoethanolamine. *J. Biol. Chem.* 267:16968-16974.

- Homans S. W., Ferguson M. A., Dwek R. A., Rademacher T. W., Anand R., Williams A. F. (1988) Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*. 333:269-272.
- Hong Y., Ohishi K., Kang J. Y., Tanaka S., Inoue N., Nishimura J., Maeda Y., Kinoshita T. (2003) Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol. Biol. Cell*. 14:1780-1789.
- Hu M-C, Guo I-C, Lin J-H, Chung B-c. (1991) Regulated expression of cytochrome P-450scc (cholesterol-side-chain cleavage enzyme) in cultured cell lines detected by antibody against bacterially expressed human protein. *Biochem. J.* 274:813-817.
- Hu M-C., Hsu N-C., Pai C-I., Wang C-K L., Chung B-c. (2001) Functions of the Upstream and Proximal Steroidogenic Factor 1 (SF-1)-Binding Sites in the CYP11A1 Promoter in Basal Transcription and Hormonal Response. *Molecular Endocrinology*. 15: 812-818.
- Huang K. S., Li S., Fung W. J., Hulmes J. D., Reik L., Pan Y. C., Low M. G. (1990) Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 265:17738-17745.
- Hyman R. (1988) Somatic genetic analysis of the expression of cell surface molecules. *Trends Genet.* 4: 5-8.
- Igarashi Y., Chambaz E. M. (1987) A novel inositolglycophospholipid and the serum dependence of its metabolism in bovine adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:249-256.
- Imai M., Shimada H., Okada Y., Matsushima-Hibiya Y., Ogishima T., Ishimura Y. (1990 a) Molecular cloning of a cDNA encoding aldosterone synthase cytochrome P-450 in rat adrenal cortex. *FEBS Lett.* 163:299-302.
- Imai T., Murata T., Ohmo M., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matsui N. (1990 b) Alteration in the expression of genes for cholesterol side-chain cleavage enzyme and 21-hydroxylase by hypophysectomy and ACTH administration in the rat adrenal. *J. Mol. Endocrinol.* 4: 239-245.
- Ikeda Y., Shen W-H., Ingraham H. A., Parker K. L. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylase. *Mol. Endocrinol.* 8:654-662.
- Itoi K., Seasholtz A. Z., Watson, S. J. (1998) Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr. J.* 45:13-33.

Iwasa F., Sassa S., Kappas A. (1989) Delta-Aminolaevulinic synthase in human HepG2 hepatoma cells. Repression by haemin and induction by chemicals. *Biochem. J.* 262:807-13.

Jefcoate C. R., DiBartolomeos M. J., Williams C. A., McNamara B. C. (1987) ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J. Steroid. Biochem.* 27:721-729.

Jefcoate C. R., McNamara B. C., Artemenko I., Yamazaki T. (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 43: 751-767.

John M. E., Okamura T., Dee A., Adler B., John M. C., White P. C., Simpson E. R., Waterman M. R. (1986) Bovine steroid 21-hydroxylase: regulation of biosynthesis. *Biochemistry.* 25:2846-2853.

Jones D. R., Avila M. A., Sanz C., Varela-Nieto I. (1997) Glycosyl-phosphatidylinositol-phospholipase type D: a possible candidate for the generation of second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:432-437.

Jones D., Varela-Nieto I. (1998) The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Int. J. Biochem. & Cell. Biol.* 30: 313-326.

Kakiki M., Morohashi K., Nomura M., Omura T., Horie T. (1997) Expression of aldosterone synthase cytochrome P450 (P450_{aldo}) mRNA in rat adrenal glomerulosa cells by angiotensin II type 1 receptor. *Endocr. Res.* 23:277-95.

Kappas A., Sassa S., Anderson K. E. (1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. Golstein J. L., Brown M. S., Eds.) pp 1302-1384, McGraw-Hill Book Co., New York.

Kappas A., Sassa S., Galbraith R. A., Nordmann Y. (1995) in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases* (Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., Eds.) pp2103-2159. 7th ed. McGraw-Hill. New York.

Kawamoto T., Mitsuuchi Y., Toda K., Yokoyama Y., Miyahara K., Miura S., Ohnishi T., Ichikawa Y., Nakao K., Imura H., Ulich S., Shizuta Y. (1992) Role of steroid 11 β -hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in human. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 89:1458-1462.

Kikuchi G., Hayashi N. (1982) in *Structure, Dynamic, and Biogenesis of Biomembranes* (Sato R., Onishi S., eds) pp 131-156. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

- Kinoshita T., Ohishi K., Takeda J. (1997) GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products and a deficiency. *J. Biochem.* 122: 251–257.
- Kloog Y., Ambar I., Sokolovsky M., Kochva E., Wollberg Z. (1988) Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*. 242:268-270.
- Koch F., Thiele H. G., Low M. G. (1986) Release of the rat T cell alloantigen RT-6.2 from cell membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* 164:1338-1343.
- Kohchi C., Ukena K., Tsutsui K. (1998) Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3 β -HSD in the postnatal rat brain. *Brain. Res.* 801:233–238.
- Kooyman D. L., Byrne G.W., McClellan S., Nielsen D., Tone M, Waldmann H., Coffman T. M, K.R. McCurry K. R., Platt J. L., Logan J. S. (1995) In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 269:89-92.
- Kramer R. E., Rainey W. E., Funkenstein B., Dee A., Simpson E. R., Waterman M. R. (1984) Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 259:707–713.
- Kwiatkowski D., Hill A. V., Sambou I., Twumasi P., Castracane J., Manogue K. R., Cerami A., Brewster D. R., Greenwood B. M. (1990) TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 336:1201–1204.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LeBoeuf R. C., Caldwell M., Guo Y., Metz C., Davitz M. A., Olson L. K., Deeg M. A. (1998) Mouse glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D (Gpld1) characterization. *Mamm. Genome*. 9:710-714.
- Lederkremer R. M. , Lima C., Ramirez M. I., Casal O. (1990) Structural features of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with glycosylphosphatidylinositol anchors. *Eur. J. Biochem.* 192:337-345.
- Lederkremer R. M. , Lima C., Ramirez M. I., Ferguson M. A. J., Homans S. W., Thomas-Oates J. (1991) Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Biol. Chem.* 266: 23670-23675.

- Le Goascogne C., Robel P., Gouezou M., Sananes N., Baulieu E. E., Waterman M. (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science*. 237:1212-1215.
- Leon Y., Vazquez E., Sanz C., Vega J. A., Mato J. M., Giraldez F., Represa J., Varela-Nieto I. (1995) Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology*. 136:3494-3503.
- Li B., Holloszy J. O., Semenkovich C. F. (1999) Respiratory uncoupling induces d-aminolevulinate synthase expression in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274:17534-17540.
- Liscum L., Dahl N. K. (1992) Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid. Res.* 33: 1239-1254.
- Low M. G., Saltiel A. R. (1988 a) Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science*. 239:268-275.
- Low M. G., Prasad A. R. S. (1988 b) A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 980-984.
- Luo X., Zeng W., Xu X., Popov S., Davignon I., Wilkie T., Mumby S., Muallem S. (1999) Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells. *J. Biol. Chem.* 274: 17684-17690.
- Luttrell L. M., Hewlett E. L., Romero G., Rogol A. D. (1988) Pertussis toxin treatment attenuates some effects of insulin in BC3H-1 murine myocytes. *J. Biol. Chem.* 263:6134-6141.
- Maeda Y., Watanabe R., Harris C. L., Hong Y., Ohishi K., Kinoshita K., Kinoshita T. (2001) PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO J.* 20: 250-261.
- Marks G. S., McCluskey S. A., Mackie J. E., Riddick D. S., James C. A. (1988) Disruption of hepatic heme biosynthesis after interactions of xenobiotics with cytochrome P 450. *FASEB J.* 2:2774-2783.
- Martiny L., Antonicelli F., Thuilliez B., Lambert B., Jacquemin C., Haye B. (1990) Control by thyrotropin of the production by thyroid cells of an inositol phosphate-glycan. *Cell. Signal.* 2:21-27.

Marver H. S., Tschudy D. P., Perloth M. G., Collins A. (1966) Studies in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 241:2806-2809.

Masterson W. J., Doering T. L., Hart G. W., Englund P. T. (1989) A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell.* 56: 793-800.

Matsukawa N., Nonaka Y., Ying Z., Higaki J., Ogihara T., Okamoto M. (1990) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding aldosterone synthase: variants of cytochrome P-450 11 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 245-252.

Matsusaka T., Ichikawa I. (1997) Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 59:395-412.

May B. K., Dogra S. C., Sadlon T. J., Bhasker C. R., Cox T. C., Bottomley S. S. (1995) Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 51:1-51.

McConville M. J., Ferguson M. A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294:305-324.

McConville M. J., Menon A. K. (2000) Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids. *Mol. Membr. Biol.* 17: 1-16.

McKenzie F., Kelly E., Unson C., Spiegel A., Milligan G. (1988) Antibodies which recognize the C-terminus of the inhibitory guanine-nucleotide-binding-protein (Gi) demonstrate that opioid peptides and foetal-calf serum stimulate the high-affinity GTPase activity of two separate pertussis-toxin substrates. *Biochem J* 249: 653-659.

Mehlert A., Varon L., Silman I., Homans S. W., Ferguson M. A. (1993) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo californica*. *Biochem. J.* 296:473-479.

Mellon S. H., Zhang P. (1997) The testis and the adrenal are (transcriptionally) the same. *Steroids.* 62:46-52.

Menon A. K., Schwarz R. T., Mayor S., Cross G. A. M. (1990) Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates. *J. Biol. Chem.* 265:9033-9042.

- Merida I., Pratt J. C., Gaulton G. N. (1990) Regulation of interleukin 2-dependent growth responses by glycosylphosphatidylinositol molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:9421-9425.
- Metz C. N., Thomas P., Davitz M. A. (1992). Immunolocalization of a glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in mast cells found in normal tissue and neurofibromatosis lesions. *Am. J. Pathol.* 140:1275-1281.
- Metz C. N., Brunner G., Choi-Muir N. H., Nguyen H., Gabrilove J., Caras I. W., Altszuler N., Rifkin D. B., Wilson E. L., Davitz M. A. (1994) Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. *EMBO J.* 13:1741-1751.
- Miller W. L. (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9:295-318.
- Miller W. L., Morel Y. (1989) The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Genet.* 23:371-93.
- Miscia S., Di Baldassarre A., Cataldi A., Rana R. A., Di Valerio V., Sabatino G. (1998) Novel evidence of expression and activity of ecto-phospholipase C gamma1 in human T lymphocytes. *Blood.* 91:3833-3840.
- Misek D. E., Saltiel A. R. (1992) An inositol phosphate glycan derived from a *Trypanosoma brucei* glycosyl-phosphatidylinositol mimics some of the metabolic actions of insulin. *J. Biol. Chem.* 267:16266-16273.
- Morel Y., Miller W. L. (1991) Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Adv. Hum. Genet.* 20:1-68.
- Mountjoy K. G., Robbins L. S., Mortrud M. T., Cone R. D. (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science.* 257:1248-1251.
- Movahedi S., Hooper N. (1997) Insulin stimulates the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase from 3T3-L1 adipocytes through the action of a phospholipase C. *Biochem. J.* 326:531-537.
- Müller J. (1988) Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects. *Monogr Endocrinol.* 29, Springer Verlag, Berlin.
- Müller J. (1995) Aldosterone: the minority hormone of the adrenal cortex. *Steroids.* 60:2-9.
- Müller G., Wetekam E., Jung C., Bandlow W. (1994) Membrane association of lipoprotein Lipase and a cAMP-binding ectoprotein in rat adipocytes. *Biochemistry.* 33:12149-12159.

- Müller G., Wied S., Crecelius A., Kessler A., Eckel J. (1997) Phosphoinositolglycan-peptides from yeast potently induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes, cardiomyocytes, and diaphragmas. *Endocrinology*. 138:3459-3475.
- Müller G., Jung C., Frick W., Bandlow W., Kramer W. (2002) Interaction of phosphatidylinositolglycan(-peptides) with plasma membrane lipid rafts triggers insulin-mimetic signaling in rat adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 408:7-16.
- Mukai K., Imai M., Shimada H., Okada Y., Ogishima T., Ishimura Y. (1991) Structural differences in 5'-flanking regions of rat cytochrome P-450ald and cytochrome P-450 11 β genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:1187-1193.
- Mukasa R., Umeda M., Endo T., Kobata A., Inoue K. (1995). Characterization of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NCAM on mouse skeletal muscle cell line C2C12: the structure of the GPI glycan and release during myogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:182-190.
- Murakami Y., Siripanyapinyo U., Hong Y., Kang J. Y., Ishihara S., Nakakuma H., Maeda Y., Kinoshita T. (2003) PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. *Mol. Biol. Cell.* 14: 4285-4295.
- Nagamune K., Nozaki T., Maeda Y., Ohishi K., Fukuma T., Hara T., Schwarz R.T., Sutterlin C., Brun R., Riezman H., Kinoshita T. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:10336-10341.
- Nagamune K., Ohishi K., Ashida H., Hong Y., Hino J., Kangawa K., Inoue N., Maeda Y., Kinoshita T. (2003) GPI transamidase of *Trypanosoma brucei* has two previously uncharacterized (trypanosomatid transamidase 1 and 2) and three common subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:10682-10687.
- Nakano Y., Noda K., Endo T., Kobata A., Tomita M. (1994) Structural study on the glycosyl-phosphatidylinositol anchor and the asparagine-linked sugar chain of a soluble form of CD59 in human urine. *Arch. Biochem. Biophys.* 311:117-126.
- Nebert D. W., Nelson D. R., Coon M. J., Estabrook R. W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Loper J. C., Sato R., Waterman M. R., Waxman D. J. (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 10: 1-14.
- Needleman P., Turk J., Jakschik B. A., Morrison A. R., Lefkowitz J. B. (1986) Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55:69-102.

Nomura M., Moroshashi K., Kirita S., Nonaka Y., Okamoto M., Nawata H., Omura T. (1993) Three forms of rat CYP11B genes: 11 β -hydroxylase gene, aldosterone synthase gene, and a novel gene. *J. Biochem. (Tokyo)* 113:144-152.

Nonaka Y., Matsukawa N., Morohashi K., Omura T., Ogiwara T., Teraoka H., Okamoto M. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat adrenal cytochrome P-450 11 β . *FEBS Lett.* 255:21-26.

Nozaki M., Ohishi K., Yamada N., Kinoshita T., Nagy A., Takeda J. (1999) Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Lab. Invest.* 79: 293–299.

Ohishi K., Inoue N., Maeda Y., Takeda J., Riezman H., Kinoshita T. (2000) Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol. Biol. Cell* 11: 1523-1533.

Ohishi K., Inoue N., Kinoshita T. (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J.* 20:4088-4098.

Ohishi K., Nagamune K., Maeda Y., Kinoshita T. (2003) Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge. *J. Biol. Chem.* 278:13959-13967.

Okamoto M., Nonaka Y. (1992) Molecular biology of rat steroid 11 β -hydroxylase [P450(11 β)] and aldosterone synthase [P450(11 β),aldo]. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 41:415-419.

Ortiz de Montellano P. R., Costa A. K., Grab L. A., Sutherland E. P., Marks G. S. (1985) *Porphyryns and Porphyrias* (Nordmann Y ed) p 109, John Libbey Eurotext Ltd., London.

Ortiz de Montellano P. R., Correia M. A. (1995) Inhibition of cytochrome P450 enzymes, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed) pp 305-364, Plenum Press, New York.

Pang S., Wallace M.A., Hofman L., Thuline H. C., Dorche C., Lyon I. C. T., Dobbins R. H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. (1988) Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics.* 81: 866-874.

Park S., Choi K., Kim I., Lee H., Hooper N., Park H. (2001) Endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C releases renal dipeptidase from kidney proximal tubules in vitro. *Biochem. J.* 353: 339-344.

Paul D. P., Gallant S., Orme-Johnson N. R., Orme-Johnson W. H., Brownie A. C. (1976) Temperature dependence of cholesterol binding to cytochrome P-450 scc of the rat adrenal. Effect of adrenocorticotrophic hormone and cycloheximide. *J. Biol. Chem.* 251:7120-7126.

Paz C., Dada L. A., Cornejo Maciel M. F., Mele P. G., Cymeryng C. B., Neuman I., Mendez C. F., Finkielstein C. V., Solano A. R., Park M., Fischer W. H., Towbin H., Scartazzini R., Podestá E. J. (1994) Purification of a novel 43-kDa protein (p43) intermediary in the activation of steroidogenesis from rat adrenal gland. *Eur. J. Biochem.* 224: 709–716.

Pecci A., Gomez-Sanchez C. E., Bedners M. E. O., Lantos C. P., Cozza E. N. (1993) *In vivo* stimulation of aldosterone biosynthesis by endothelin: loci of action and effects of doses and infusion rates. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 45:555-561.

Podvinec M., Handschin C., Looser R., Meyer U. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:9127-9132.

Privalle C. T., Crivello J., Jefcoate C. R. (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450scc in rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:702-706.

Puoti A., Desponds C., Fankhauser C., Conzelmann A. (1991) Characterization of glycopospholipid intermediate in the biosynthesis of glycoposphatidylinositol anchors accumulating in the Thy-1-negative lymphoma line SIA-b. *J. Biol. Chem.* 266:21051-21059.

Rangarajan P. N., Padmanaban G. (1989) Regulation of cytochrome P-450b/e gene expression by a heme- and phenobarbitone-modulated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3963-3967.

Redman C.A., Thomas-Oates J. E., Ogata S., Ikehara Y., Ferguson M. A. (1994) Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 302:861-865.

Reinhart A., Williams S., Clark B., Stocco D. (1999) SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol. Endocrinol.* 13:729-741.

Remy-Jouet I., Cartier F., Lesouhaitier O., Kuhn J. M., Fournier A., Vaudry H., Delarue C. (1998) Mechanism of action of endothelins on adrenocortical cells. *Horm. Metab. Res.* 30:341-5.

- Represa J., Avila M. A., Miner C., Giraldez F., Romero G., Clemente R., Mato J. M., Varela-Nieto I. (1991). Glycosyl-phosphatidylinositol/inositol phosphoglycan: a signaling system for the low-affinity nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:8016-801.
- Reyland M. E., Evans R. M., White K. (2000) Lipoproteins regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in mouse adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 275:36637-44.
- Roberts J., Kenton P., Jhonson P. (1990) Growth factor-induced release of a glycosyl-phosphatidylinositol(GPI)-linked protein from HEp-2 human carcinoma cell line. *FEBS Letter.* 267: 213-216.
- Roberts W. L., Kim B. H., Rosenberry T. L. (1987) Differences in the glycolipid membrane anchors of bovine and human erythrocyte acetylcholinesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7817-7821.
- Roberts W. L., Santikara S., Reinhold V. N., Rosenberry T. L. (1988 a) Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 263: 18776-18784.
- Roberts W. L., Myher J.J., Kuksis A., Low M. G., Rosenberry T. L. (1988 b) Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 263: 18766-18775.
- Rodrigues N. R., Dunham I., Yu C.Y., Carroll M. C., Porter R. R., Campbell R. D. (1987) Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J.* 6: 1653-1661.
- Romero G., Luttrell L., Rogol A., Zeller K., Hewlett E., Lerner J. (1988) Phosphatidylinositol-Glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. *Science.* 240: 509-511.
- Romero G., Gamez G., Huang L.C., Lilley K., Luttrell L. (1990) Anti-inositolglycan antibodies selectively block some of the actions of insulin in intact BC3 H1 cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1476-1480.
- Rossi G. P., Albertin G., Bova S., Belloni A., Fallo F., Pagotto U., Trevisi L., Palu G., Pessina A. C., Nussdorfer G. G. (1997) Autocrine-Paracrine Role of Endothelin-1 in the Regulation of Aldosterone Synthase Expression and Intracellular Ca²⁺ in Human Adrenocortical Carcinoma NCI-H295 Cells. *Endocrinology.* 138:4421-4426.
- Rubanyi G. M., Polokoff M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46:325-415.

Sakata N., Stoops J., Dixon J. (1999) Cytosolic components are required for proteasomal degradation of newly synthesized apolipoprotein B in permeabilized HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 274: 17068-17074.

Sakurai T., Yanagisawa M., Takawa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., Masaki T. (1991) Cloning of cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature.* 348:732-735.

Saltiel A. (1987) Insulin generates an enzyme modulator from hepatic plasma membranes: regulation of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase, pyruvate dehydrogenase and adenylate cyclase. *Endocrinology.* 120: 967-972.

Saltiel A. L. (1994) The paradoxical regulation of protein phosphorylation in insulin action. *FASEB Journal.* 8:1034-1040.

Sanchez-Arias J. A., Sanchez-Gutierrez J. C., Guadaño A., Alvarez J. F., Sanchez B., Mato J. M., Feliu J. E. (1992) Impairment of glycosyl-phosphatidylinositol-dependent insulin signaling system in isolated rat hepatocytes by streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology.* 131: 1727-1733.

Sander M., Ganten D., Mellon S. (1994) Role of adrenal renin in the regulation of adrenal steroidogenesis by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:148-152.

Sandhoff T., Hales D., Hales K., McLean M. (1998) Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology.* 139: 4820-4831.

Satoshi Tanaka, Yusuke Maeda, Yuko Tashima and Taroh Kinoshita. (2004) Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J. Biol. Chem.* 279:14256-63.

Scallion B.J., Fung W. J., Tsang T. C., Li S., Kado-Fong H., Huang K. S., Kochan J. P. (1991) Primary structure and functional activity of a phosphatidylinositol- glycan-specific phospholipase D. *Science.* 252:446-448.

Schneider P., Ferguson M. A., McConville M. J., Mehlert A., Homans S. W., Bordier C. (1990) Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J. Biol. Chem.* 265:16955-16964.

Schofield L., Hackett F. (1993) Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. M.* 177:145-153.

Schofield L., Novakovic S., Gerold P., Schwarz R. T., McConville M. J., Tachado S. D. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via protein tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J. Immunol.* 156: 1886–1896.

Scott L. V., Dinan T. G. (1998) Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.* 62:1985-1998.

Serrano A. A., Schenkman S., Yoshida N., Mehlert A., J.M. Richardson J. M., Ferguson M. A. (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.* 270:27244-27253.

Singh N., Liang L., Tykocinski M., Tartakoff A. (1996) A novel class of cell surface glycolipids of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271: 12879-12884.

Smith W. I. (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* 259:315–324.

Smith T. K., Sharma D. K., Crossman A., Dix A., Brimacombe J. S., Ferguson M. A. (1997) Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *EMBO J.* 16:6667–6675.

Soeder K., Snedden S., Cao W., Della-Roca G., Daniel K., Luttrell L., Collins S. (1999) The β_3 -adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 12017-12022.

Solano A. R., Neger R. Podesta E. J. (1984) Rat adrenal cycloheximide-sensitive factors and phospholipids in the control of acute steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem.* 21:111-116.

Speiser P. W., New M. I., White P. C. (1988) Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1.N. *Engl. J. Med.* 319:19-23.

Speiser P. W., Dupont J., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusie-Luna M. T., Lesser M., New M. I., White P. C. (1992) Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 90:584-595.

Srivastava G., Borthwick I. A., Maguire D., Elferink C. J., Bawden M. J., Mercer J. F. B., May B. K. (1988) Regulation of 5-Aminolevulinic Synthase mRNA in Different Rat Tissues. *J. Biol. Chem.* 263:5202-5209.

Srivastava V., Bawden M. J., Anderson A., May B. K. (1989) Drug induction of P450IIB1/IIB2 and 5-aminolevulinate synthase mRNAs in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1007:192-195.

Srivastava G., Kwong K. Y., Lam K. S. L., May B. K. (1992) Effect of dexamethasone on mRNA levels for 5-aminolevulinate synthase in different rat tissues. *Eur. J. Biochem.* 203:59-65.

Stahl N., Baldwin M. A., Hecker R., Pan K. M., Burlingame A. L., Prusiner S. B. (1992) Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry.* 31:5043-5053.

Stevens V. L., Wu T., Lambeth J. D. (1993) Cholesterol trafficking in steroidogenic cells: reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a pre-steroidogenic pool. *Eur. J. Biochem.* 216:557-563.

Stevens V. L. (1995) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* 310:361-370.

Stocco D. M., Clark B. C. (1996) Regulation of the acute production of steroid in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* 17: 221-244.

Stocco D. M. (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 26:184-97.

Strassheim D., Milligan G., Houslay M. (1990) Diabetes abolishes the GTP-dependent but not the receptor-dependent inhibitory function of the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory protein (Gi) on adipocyte adenylate cyclase activity. *Biochem. J.* 266: 521-526.

Strauss J. F. 3rd, Kallen C. B., Christenson L. K., Watari H., Devoto L., Arakane F., Kiriakidou M., Sugawara T. (1999) The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent. Prog. Horm. Res.* 54:369-394.

Sugawara T., Holt J. A., Kiriakidou M., Strauss J. F. (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry.* 35: 9052-9059.

Sugawara T., Kiriakidou M., McAllister J., Kallen C., Strauss J. F. (1997) Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry.* 36: 7249-7255.

- Svensson L. T., Wilcke M., Alexson S. H. (1995) Peroxisome proliferators differentially regulate long-chain acyl-CoA thioesterases in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 230: 813–820.
- Tachado S. D., Novakovic S., Gerold P., McConville M. J., Baldwin T., Quilici D., R.T. Schwarz, Schofield L. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthetase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 156:1897–1907.
- Tachado S. D., Gerold P., Schwarz R., Novakovic S., McConville M., Schofield L. (1997) Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4022–4027.
- Taguchi R., Asahí Y., Ikezawa H. (1985) Ectoenzyme release fr rat liver and kidney by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biochem.* 97: 911-921.
- Taguchi R., Hamakawa N., Harada-Nishida M., Fukui T., Nojima K., Ikezawa H. (1994) Microheterogeneity in glycosylphosphatidylinositol anchor structures of bovine liver 5'-nucleotidase. *Biochemistry.* 33:1017-1022.
- Takizawa C. G., Weis K., Morgan D. O. (1999) Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7938-7943.
- Tan D., Ferreira G. C. (1996). Active site of 5-aminolevulinate synthase resides at the subunit interface. Evidence from in vivo heterodimer formation. *Biochemistry.* 35:8934-8941. Erratum in: *Biochemistry* (1997) 36:4712.
- Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Abrahami D., Lazlo L., Prusiner S. B., Abrahami D. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell. Biol.* 129: 121-132.
- Tee M. .K., Babalola G. O., Aza-Blanc P., Speek M., Gitelman S. E., Miller W. L. (1995). A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element? *Hum. Mol. Genet.* 4:2109-2116.
- Tiede A., Bastisch I., Schubert J., Orlean P., Schmidt R. E. (1999) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol. Chem.* 380: 503–52.
- Toaff M. E., Strauss III J. F., Flinckinger G. L., Shattil S. J. (1979) Relationship of cholesterol supply to luteal mitochondrial steroid synthesis. *J. Biol. Chem.* 254:3977-3982.

- Treumann A., Lifely M. R., Schneider P., Ferguson M. A. (1995) Primary structure of CD52. *J. Biol. Chem.* 270:6088-6099.
- Udenfriend S., Kodukula K. (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64:563-91.
- Ueda E., Sevlever D., Prince G. M., Rosenberry T., Hirose S., Medof M. E. (1993) A candidate mammalian glycoinositol phospholipid precursor containing three phosphoethanolamines. *J. Biol. Chem.* 268:9998-10002.
- Urakaze M., Kamitani T., DeGasperi R., Sugiyama E., Chang H. M., Warren C. D., Yeh E. T. H. (1992) Identification of a missing link in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 267: 6459-6462.
- Vaena de Avalos S., Lima C., Martini C. N., Lederkremer R. M., Vila M. C. (1998) ACTH-mediated glucocorticoid and mineralocorticoid production is inhibited by an inositolphosphoglycan and a glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C is activated by the hormone in mammalian adrenocortical cells. *Steroids.* 63: 70-75.
- Varone C. L., Giono L.E., Ochoa A., Zakin M. M., Cánepa E. T. (1999) Transcriptional regulation of 5-aminolevulinate synthase by phenobarbital and c-Amp-dependent protein kinase *Arch. Biochem. Biophys.* 372:261-270.
- Vidugiriene J., Menori A. K. (1993) Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell. Biol.* 121: 987-996.
- Vila M. C., Milligan G., Standaert M., R.V.Farese R. V. (1990) Insulin activates glycerol-3-phosphate acyltransferase (de novo phosphatidic acid synthesis) through a phospholipid-derived mediator. Apparent involvement of Gi and activation of a phospholipase C. *Biochemistry.* 29: 8735-8740.
- Vila M. C., Farese R. V. (1991) Insulin rapidly increases glycerol-3-phosphate-acyltransferase activity in rat adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 284:366-368.
- Vila M. C., Cozza E. N., Ramirez M., Lima C., Lederkremer R. (1995) An inositol phosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* inhibits ACTH action in calf adrenocortical cells. *Cellular Signalling.* 7: 331.
- Villalba M, Kelly K, Mato J. (1988) Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochim. Biophys. Acta.* 968:69-76.
- Wada A., Okamoto M., Nonaka Y., Yamano T. (1984) Aldosterone biosynthesis by a reconstituted cytochrome P 450-11 β system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 365-371.

- Waldron R., Rozengurt, E. (2000) Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J Biol. Chem.* 275:17114-17121.
- Wang X. J., Stocco D. M. (1999) Cyclic AMP and arachidonic acid: a tale of two pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 158:7-12.
- Wang X. J., Walsh P. L., Reinhart, Stocco D. M. (2000) The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J. Biol. Chem.* 275:20204-20209.
- Wang X. J., Dyson M. T., Mondillo C., Patrignani Z., Pignataro O, Stocco D. M. (2002) Interaction between arachidonic acid and cAMP signaling pathways enhances steroidogenesis and StAR gene expression in MA-10 Leydig tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188:55-63.
- Wang X. J., Dyson M. T., Jo Y., Eubank D. W., Stocco D. M. (2003) Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 85:159-166.
- Watari H., Arakane F., Moog-Lutz C., Kallen C. B., Tomasetto C., Gerton G. L., Río M. C., Baker M. E., Strauss J. F. Jr. (1997) MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8462-8467.
- Waterman M. R., Bischof L. J. (1997) Cytochromes P450 12: diversity of ACTH (cAMP)-dependent transcription of bovine steroid hydroxylase genes. *FASEB J.* 11:419-427.
- Wei P., Zhang J., Egan-Hafley M., Liang S., Moore D. D. (2000) The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature.* 407:920-923.
- Weissmann C., Flechsig E. (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Compelling linkage between the Br. Med. Bull.* 66:43-60.
- White P.C., Grossberger D., Onufer B. J., Chaplin D. D., New M. I., Dupont B., Strominger J. L. (1985). Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1089-1093.
- White P.C., New M. I., Dupont B. (1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:5111-5115.

- White P. C., Speiser P. W. (2000) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews*. 21: 245–291.
- Woodcock W. A., Little P. J., Tanner J. K. (1990) Inositol phosphate release and steroidogenesis in rat adrenal glomerulosa cells. Comparison of the effects of endothelin, angiotensin II and vasopressin. *Biochem. J.* 271:791-796.
- Yamamoto M., Kure S., Engel D., Hiraga K. (1988) Structure, Turnover, and Heme-mediated Suppression of the Level of mRNA Encoding Rat Liver δ -Aminolevulinato Synthase. *J. Biol. Chem.* 263: 15973-15979.
- Yanagibashi K., Haniu M., Shively J. E., Shen W. H., Hall P. (1986) The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) posses one enzyme of 11 β , 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J. Biol. Chem.* 61:3556-3562.
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Nitsui Y., Yazaki Y. Goto K., Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 332:411-415.
- Yule D., Williams J. (1992) U 73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 267: 13830-13835.
- Zamze S., Ferguson M., Collins R., Dwek R., Rademacher T. (1988) Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 176: 527-534.
- Zhang P., Rodriguez H., Mellon S. H. (1995) Transcriptional regulation of P450_{scc} gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. *Mol. Endocrinol.* 9:1571–1582.
- Zhou M.Y., Vila M. C., Gomez-Sanchez E. P., Gomez-Sanchez C. E. (1997) Cloning of Two Alternatively Spliced 21-Hydroxylase cDNAs from Rat Adrenal. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 62:277-286.