

Tesis Doctoral

# Regulación de la esteroidogénesis y la espermiación en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura)

Czuchlej, Silvia Cristina

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Czuchlej, Silvia Cristina. (2018). Regulación de la esteroidogénesis y la espermiación en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6515\\_Czuchlej](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6515_Czuchlej)

Cita tipo Chicago:

Czuchlej, Silvia Cristina. "Regulación de la esteroidogénesis y la espermiación en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6515\\_Czuchlej](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6515_Czuchlej)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Regulación de la esteroidogénesis y la espermiación  
en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Silvia Cristina Czuchlej

Directora de Tesis: Dra. Nora R. Ceballos

Consejera de Estudios: Dra. Nora R. Ceballos

Lugar de trabajo: Laboratorio de Endocrinología Comparada,  
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA,  
Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 11 de diciembre de 2018.

## Regulación de la esteroidogénesis y la espermiación en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).

En los anfibios estudiados, tanto la esteroidogénesis como la espermiación pueden ser estimuladas por las distintas gonadotrofinas: la hormona luteinizante (LH), la gonadotrofina coriónica humana (hCG) y la hormona folículoestimulante (FSH). En *Rhinella arenarum*, la acción de hCG sobre la espermiación no requiere de la biosíntesis de esteroides aunque para la regulación de ambos procesos se requeriría la activación de la proteína quinasa A (PKA). Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar la participación de la PKA y de la proteína quinasa C (PKC) en la acción de las gonadotrofinas sobre la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulator protein), considerada en mamíferos el paso limitante y hormonalmente regulable de la esteroidogénesis, y sobre el proceso de espermiación. Para el estudio de la regulación de la esteroidogénesis, primero se llevó a cabo la caracterización molecular del ADN copia (ADNc) de StAR. Los resultados obtenidos mostraron no solo un alto porcentaje de similitud de la secuencia de StAR con la proteína de otros vertebrados sino también la conservación de los sitios consenso para la fosforilación por PKA descritos en mamíferos. Esto último resultó consistente con el aumento de la expresión del ARN mensajero ante los estímulos de hCG o de activadores de PKA, aumentos que no se observaron en la expresión de la proteína. Además, dado que en esta especie los glucocorticoides disminuyen la síntesis de andrógenos, procedimos al análisis del efecto de los mismos sobre la proteína StAR y sobre la producción de esteroides. No se observaron variaciones en la expresión basal de la proteína ni en la estimulada por hCG, luego del tratamiento con distintas dosis de corticosterona o dexametasona. Esto permite inferir que la disminución de la síntesis de andrógenos por efecto de los glucocorticoides no está relacionada con la proteína StAR. Para el estudio de la espermiación, proceso dependiente de gonadotrofinas, se analizaron tanto la función no canónica de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  como la activación de las vías de PKA y PKC. Los resultados obtenidos refuerzan la propuesta de la participación de la forma no canónica de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y del rol de PKA en el proceso de espermiación pero no de PKC. Por otra parte, sólo la activación de PKA afectó significativamente la producción de testosterona, confirmando que la esteroidogénesis y la espermiación se regulan por distintos mecanismos.

Palabras clave: sapo, testículo, esteroidogénesis, espermiación, StAR, gonadotrofinas.

## Regulation of steroidogenesis and spermiation in *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).

It is well known that in several amphibians both steroidogenesis and spermiation process are stimulated by different gonadotrophins such as luteinizing hormone (LH), human chorionic gonadotropin (hCG) and follicle stimulating hormone (FSH). The action of hCG on *Rhinella arenarum*'s spermiation does not require the synthesis of steroids although both spermiation and steroidogenesis are regulated by pathways including protein kinase A (PKA) activation. One of the aims of this thesis was to study the role of PKA and protein kinase C (PKC) in the effect of gonadotrophins on StAR protein (Steroidogenic Acute Regulator protein), the rate-limiting hormonal-regulated step in mammalian steroidogenesis as well as on the spermiation process. First of all, the molecular characterization of the cDNA sequence of StAR was carried out in order to allow the study of steroidogenesis regulation. Results showed that StAR sequence of *R. arenarum* shares high percentage of similarity with other vertebrate's proteins, conserving similar consensus sites for PKA phosphorylation, as described in mammals. Treatments with hCG or PKA activators stimulate mRNA expression with no effect on protein synthesis. Furthermore, since in this specie plasma glucocorticoids concentrations are highest during the reproductive season, these concentrations producing a decrease in androgen synthesis, their effects on StAR protein expression were analyzed. After treatments with different concentrations of corticosterone or dexamethasone no variations in basal and hCG-stimulated expression of the protein were observed. These results allow the speculation that glucocorticoid-induced decrease in androgen synthesis is not due to the inhibition of StAR protein. Moreover, the non-canonical function of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump and the activation of the PKA and PKC pathways for spermiation were also analyzed. Results reinforce the idea that the non-canonical form of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump and PKA are important participants in hCG-induced spermiation, excluding a role for PKC. On the other hand, only PKA activation increased the production of testosterone. Taken together, these results confirm that steroidogenesis and spermiation are regulated by different mechanisms.

Keywords: toad, testes, steroidogenesis, spermiation, StAR, gonadotrophins.

## Publicaciones

Los resultados presentados en el Capítulo 2 de esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

Czuchlej SC, Regueira E, Volonteri MC, Ceballos NR. 2018. Effect of glucocorticoids on androgen biosynthesis in the testes of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). J. Exp. Zool. 1, 10. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.2232>.

Los resultados presentados en el Capítulo 3 de esta tesis forman parte de la siguiente publicación en redacción:

Czuchlej SC, Volonteri MC, Scaia MF, Ceballos NR. Characterization of StAR protein of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Por las horas vividas, por lo mucho aprendido. Por la formación de calidad. Por los momentos de felicidad, de ansiedad, de cansancio, de curiosidad, de esfuerzo, de vulnerabilidad, de asombro. Todo me formó. De todo, aprendí.

A la Universidad de Buenos Aires. Por el financiamiento de mi formación.

A este grandioso país que otorga el derecho a recibir educación laica, libre y gratuita.

A Nora Ceballos. Me abrió la puerta de su laboratorio, me dio la oportunidad y los medios para realizar mi doctorado. Compartimos muchísimas horas a lo largo de estos años, con idas y vueltas, con altas y con bajas, pero con la íntima convicción de saber que el trabajo valía la pena. Gracias.

A Mi Pequeña Ciudad, a su personal docente y no docente. Mil gracias por tanta dedicación y cuidado con mis (ex) pequeños Feli y Juano.

A Clarucha, Flori, Ele y Nadia. Por compartir horas de mesada, trabajos, protocolos, dudas, muchas dudas. Agradezco las explicaciones, la paciencia y, principalmente, la buena onda, el ánimo y la amistad, en todo momento.

A Gladys. Por estar siempre, sea lo que sea que yo necesitara.

A Juliana Gimenez. Por confiar y darme la posibilidad de iniciar mi camino en la docencia universitaria. Por alentarme siempre a seguir avanzando.

A Rodrigo Da Cuña. Por permitirme aprender tanto de biología como de docencia.

A Cora Alvarez. Por ser tan magnífica persona y compañera.

A Paula, Martina y Lorena. Por el entusiasmo en las largas horas de TP y seminario.

A Majo, Mariela, Mariel, Henri, Eugenia y Celeste. Por "el equipo" docente.

A Juan Carlos Calvo y Omar Coso. Por ser referentes importantes en lo profesional y en lo personal.

A la Dra. Elba Vasquez, por su generosidad. A Javier Brandani, por su buena predisposición.

A Fabiana Lo Nostro, Paula Vissio, Dante Paz y sus respectivos grupos de investigación. Por la colaboración en "inesperadas" complicaciones del día a día.

A Ignacio Souza. Por las explicaciones de filogenia.

A Mary Ruina y Ana Bruno. En aquellos años, hormonalmente alterados de la adolescencia, supieron transmitir con bella docencia y mucho entusiasmo que las ciencias naturales son geniales.

A Virginia Alderete. Por compartir una hermosa amistad en años en los cuales todo era aprendizaje y por enseñarme un camino del cual no tenía referencias.

A Patricia Amorin Campos. Por su incondicional amistad y fraternal ayuda. Sos y seguirás siendo el principio de todo.

A Miguel Angel Paleari. Por el empujón que me ayudó a ver que entre tanta contabilidad, sueldos y ventas, el camino seguía.

A Cynthia Susic y Romina Morresi. Por ser maravillosas personas, por compartir muchas horas de charlas, de estudio y de mate.

A Diana Mendez y Marina Grus. Por su excelencia profesional y su poderosa herramienta de trabajo que llega donde no lo hace el bisturí.

A Sylvia Fischer y Alejandra Ribichich. Por ayudarme a ver más allá.

A Román, Romina y Sebastián. Por cuidar a mi pequeño Juano en muchas ocasiones. Por las charlas que me permitieron ver cosas que no siempre están a la vista.

A Julia, Tico y el Golcito. Por la inmensa amistad y los momentos compartidos. Y a los amigos ganados por "transitividad": Lorena, Pablo, Lía y Fernando.

A los amigos Bessie, Daniel, Eda, Gabriela, Mariana, Maxy, Pablo, Paula, y Poly; Andre, Cami y Diego; Cris, Bianca y Ariel. Gracias por compartir familia y amistad.

A Estani, Ana y Ahmed. Por estar siempre, en todo momento.

A Mary Scheiner y Nino Cafure. Por hacerme sentir en casa, por el ejemplo y por esa hermosa persona que supieron educar con quién formé mi familia.

A mamá Valeria Hulak y papá Anatolio Czuchlej. Por sus aciertos, sus errores, por el trabajo, por no aflojar, por querer lo mejor para nosotras y, principalmente, por el amor. Solo tengo admiración y gratitud.

A mi hermana Su. Por ser bella, amada, genial, incondicional, sorprendente, infalible, grande, modelo, irremplazable, divertida, brava, luchadora, creativa.

A Dani. Por ser el incondicional compañero de Su. Por compartir, ayudar y estar en todo y para todos.

A los más importantes, mis amores: Juano, Feli y Nino. No me alcanzan las palabras, ni las frases, ni los ejemplos para expresar lo que ustedes son para mí. Tampoco alcanzan los agradecimientos, ni los cumplidos porque nada me parece suficiente. Solo quiero que sepan que siempre voy a desear para ustedes lo mejor y que cada una de sus sonrisas también es y será una sonrisa mía.

Esta tesis está dedicada a Valeria Hulak  
por la vida, el amor, el ejemplo y el trabajo.

## Índice

|                                                                                                 |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Introducción                                                                                    | 1-23  |
| Los anfibios                                                                                    | 1     |
| Los anuros                                                                                      | 1     |
| <i>Rhinella arenarum</i>                                                                        | 2     |
| Regulación de la reproducción                                                                   | 3     |
| El testículo                                                                                    | 4     |
| Espermatogenesis                                                                                | 5     |
| Espermiación                                                                                    | 6     |
| La Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa                                                       | 8     |
| Los esteroides testiculares                                                                     | 10    |
| La proteína StAR y su rol en la esteroidogénesis                                                | 12    |
| El órgano de Bidder                                                                             | 14    |
| Los esteroides del órgano de Bidder                                                             | 14    |
| La glándula adrenal/interrenal                                                                  | 16    |
| Los esteroides adrenales                                                                        | 16    |
| El estrés                                                                                       | 17    |
| Los glucocorticoides                                                                            | 18    |
| El receptor de glucocorticoides                                                                 | 19    |
| La enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa                                           | 21    |
| Objetivos e Hipótesis                                                                           | 24-25 |
| Capítulo I                                                                                      | 24    |
| Capítulo II                                                                                     | 24    |
| Capítulo III                                                                                    | 25    |
| Apéndice Soluciones y Buffers                                                                   | 26    |
| Abreviaturas                                                                                    | 27-28 |
| Sinonimia                                                                                       | 29    |
| Capítulo 1. Regulación de la espermiación y la síntesis de esteroides                           | 30-46 |
| Materiales y Métodos                                                                            | 30    |
| Animales                                                                                        | 30    |
| Obtención del material biológico                                                                | 31    |
| Tratamiento <i>in vitro</i> de fragmentos testiculares                                          | 31    |
| Papel de la bomba Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa                                        | 31    |
| Rol de la PKC en la activación función no canónica de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa | 32    |

|                                                                                                                                                            |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Rol de la PKA en la espermiación y la esteroidogénesis estimulada por FSHrh                                                                                | 33     |
| Cuantificación de la espermiación                                                                                                                          | 34     |
| Cuantificación de de andrógenos mediante radioinmunoanálisis                                                                                               | 34     |
| Análisis estadístico                                                                                                                                       | 35     |
| Resultados y discusión                                                                                                                                     | 36     |
| Rol de FSHrh en la regulación de la espermiación                                                                                                           | 41     |
| Capítulo 2. Regulación de la esteroidogénesis testicular                                                                                                   | 47-70  |
| Materiales y Métodos                                                                                                                                       | 47     |
| Animales                                                                                                                                                   | 47     |
| Obtención del material biológico                                                                                                                           | 47     |
| Rol de los glucocorticoides en la regulación de la síntesis de andrógenos                                                                                  | 47     |
| Efecto de corticosterona sobre la secreción basal y estimulada de andrógenos                                                                               | 47     |
| Rol del receptor de glucocorticoides (GR) y de la enzima 11 $\beta$ -HSD en el efecto de corticosterona sobre la síntesis basal y estimulada de andrógenos | 48     |
| Rol de la proteína StAR en la regulación de la síntesis de andrógenos                                                                                      | 49     |
| Experimentos preliminares                                                                                                                                  | 49     |
| Efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre la proteína StAR                                                                                      | 49     |
| Rol de los glucocorticoides en la regulación de la proteína StAR                                                                                           | 50     |
| Obtención de fracciones subcelulares                                                                                                                       | 50     |
| Validación del anticuerpo anti StAR                                                                                                                        | 52     |
| Mediciones por Western blot                                                                                                                                | 53     |
| Cuantificación de andrógenos                                                                                                                               | 55     |
| Análisis estadístico                                                                                                                                       | 55     |
| Resultados y discusión                                                                                                                                     | 56     |
| Efecto de corticosterona sobre la secreción de andrógenos basal y estimulada por hCG                                                                       | 56     |
| Validación del anticuerpo anti StAR                                                                                                                        | 60     |
| Tratamientos <i>in vitro</i> de fragmentos testiculares                                                                                                    | 61     |
| Efecto de hCG sobre la expresión de StAR                                                                                                                   | 64     |
| Capítulo 3. Análisis molecular de la proteína StAR                                                                                                         | 71-121 |
| Materiales y métodos                                                                                                                                       | 71     |
| Animales                                                                                                                                                   | 71     |
| Obtención del material biológico                                                                                                                           | 71     |
| Secuenciación del mensajero de StAR                                                                                                                        | 71     |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Extracción y cuantificación del ARN total                                                             | 71  |
| Transcripción reversa (RT)                                                                            | 72  |
| PCR (Reacción en cadena de la ADN polimerasa) degenerada de StAR                                      | 73  |
| Amplificación de los extremos 3' y 5'                                                                 | 74  |
| Análisis de la secuencia nucleotídica                                                                 | 77  |
| Obtención del ARNm de StAR utilizando ARN de testículo                                                | 77  |
| Alineamiento múltiple de secuencias                                                                   | 78  |
| Análisis filogenético                                                                                 | 78  |
| Regulación de la expresión de ARNm de StAR                                                            | 79  |
| Efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre el ARNm de StAR                                  | 79  |
| PCR cuantitativa en tiempo real                                                                       | 80  |
| Resultados y discusión                                                                                | 81  |
| Secuenciación de StAR y análisis filogenético                                                         | 81  |
| Caracterización molecular de StAR                                                                     | 81  |
| Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica                                                  | 87  |
| Verificación de secuencia del ARNm de StAR utilizando ARN de testículo                                | 90  |
| Comparación de la secuencia aminoacídica de <i>R. arenarum</i> con<br>secuencias de otros vertebrados | 92  |
| Análisis filogenético                                                                                 | 109 |
| Expresión diferencial de StAR                                                                         | 116 |
| Efecto de reguladores de la esteroidogénesis sobre la expresión de StAR                               | 117 |
| Conclusiones                                                                                          | 122 |
| Bibliografía                                                                                          | 127 |

# I Introducción

## Introducción

### Los anfibios

Los anfibios son los únicos vertebrados actuales que, en su mayoría, transcurren una parte de su ciclo de vida en el agua y otra en la tierra. Este doble hábitat se expresa en su nombre, “anfibios”, vocablo proveniente del latín del que se usa habitualmente el plural neutro *amphibia* para referirse al grupo que representa a estos animales. De manera general denominamos anfibios a los individuos que habitan los ambientes terrestres y acuáticos, en mayor o menor medida, según el estadio de desarrollo y la especie a la cual pertenezcan.

Por su origen evolutivo se los considera uno de los grupos de descendientes de los primeros tetrápodos devonianos. Estos últimos evolucionaron a partir de un grupo primitivo de peces con aletas lobuladas, las cuales habrían dado origen a las extremidades. Se calcula que esto ocurrió entre los períodos Devónico y Carbonífero de la era Paleozoica (Maddison y Schulz, 2007).

Los anfibios son animales poiquilotermos y constituyen, probablemente, el grupo que está expuesto, según las especies y su distribución, a las oscilaciones más amplias de temperatura, tanto estacionales como diarias. Además, este grupo se incluye en la categoría de los más amenazados, con un 31,62% de las especies en algún tipo de riesgo (IUCN, 2017, <http://www.iucnredlist.org>) y entre los factores que más contribuyen se encuentra, entre otros, la contaminación producto de la actividad humana (Relyea y Mills, 2001; Blaustein y col., 2003; Zikov y col., 2017).

Los anfibios actuales se reúnen en el grupo Lissamphibia que se dividen en tres clados, Anura (sapos, ranas y escuerzos), Caudata (salamandras) y Gymnophiona (cecilias). La base de datos de “The AmphibiaWeb” incluye en la actualidad 7.932 especies (10 de septiembre, 2018), de las cuales 7.007 pertenecen al orden Anura, 716 al orden Caudata y 209 al orden Gymnophiona (<https://amphibiaweb.org/taxonomy/index.html>).

### Los anuros

Como se mencionó en el párrafo anterior, los anfibios anuros incluyen a las ranas, los escuerzos y a los sapos. Estas agrupaciones no están definidas por una clasificación taxonómica pero hacen referencia a los tres grandes grupos eco-morfológicos que se distribuyen en una numerosa cantidad de hábitats y alcanzan una distribución geográfica casi cosmopolita (Vitt y Caldwell, 2009). Constituyen el grupo más

numeroso de los anfibios, cerca del 87% de las especies conocidas hasta el momento. Los adultos de estos grupos se diferencian del resto de los anfibios por carecer de cola, tener un cuerpo corto y miembros posteriores más desarrollados que los anteriores, adaptados para saltar o nadar. En contraste con las salamandras y la cecillas, la mayoría de los anuros tienen fecundación externa y una amplia diversidad de modos reproductivos.

### *Rhinella arenarum*

*Rhinella arenarum* (ex *Bufo arenarum*, Frost, 2011) o, como se lo conoce comúnmente en Argentina, “sapo común”, es un anfibio anuro sudamericano con una extensa distribución geográfica, que abarca desde el departamento de Cochabamba en Bolivia hasta la provincia de Chubut en Argentina, y desde el estado brasileño de Río Grande do Sul hasta el lado argentino de la cordillera de los Andes (Gallardo, 1965; Vaira y col., 2012). Esta región se caracteriza por tener ambientes muy heterogéneos, sin embargo, la especie presenta pocos indicios de diferenciación en subespecies. La gran diversidad de hábitats que caracteriza a *R. arenarum* se debe, probablemente, a que es una especie adaptada no sólo a la vida en distintas condiciones térmicas sino también a distintas situaciones de humedad y altitud. Se la encuentra desde regiones de clima tropical a regiones con temperaturas cercanas a 0°C, y en zonas húmedas de más de 1000 mm anuales de precipitación a zonas secas con menos de 500 mm. Además, existen poblaciones que habitan regiones situadas a nivel del mar y otras a 2500 metros de altura (Incachaca, Bolivia).

Como miembro de la familia Bufonidae *R. arenarum* tiene rasgos característicos de los bufónidos tales como 1) presencia de órgano de Bidder; 2) ausencia de dientes; 3) ausencia de músculo constrictor posterior; 4) cuerpos grasos inguinales; 5) cráneo altamente osificado.

Con respecto a sus características reproductivas, se sabe que los machos de la especie llegan a la madurez sexual en el cuarto año de vida. La cuarta onda espermatogénica comienza en la primavera del tercer año y finaliza en la primavera del cuarto año, momento en el cual los machos adultos se reproducen por primera vez (Echeverría, 1987). Los estudios realizados por Gallardo (1974) sobre poblaciones de *R. arenarum* distribuidas en el Gran Buenos Aires y La Plata, mostraron que la época reproductiva abarca desde mediados de septiembre a principios de diciembre (primavera), periodo durante el cual ocurren las mayores precipitaciones. Durante esta época, los machos adultos cantan para llamar a las hembras las cuales ingresan al agua. Allí son abrazadas por el dorso por los machos que se sujetan fuertemente con

sus extremidades anteriores por debajo de las extremidades anteriores de la hembra, proceso denominado “amplexo”. Durante este proceso ocurren cambios hormonales que llevan a que a medida que la hembra libera los oocitos el macho descarga de manera coordinada el fluido seminal, produciéndose la fecundación (Vu y Trudeau, 2016). Todo lo mencionado implica la producción de una gran cantidad de gametas por parte de ambos sexos como también que la liberación de las mismas sea un proceso sincrónico y altamente regulado, lo cual requiere una delicada coordinación entre varias señales fisiológicas, conductuales y ambientales que dependen de las interacciones subyacentes entre los sistemas endócrino y nervioso (Vu y Trudeau, 2016).

### Regulación de la reproducción

La reproducción es regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, en el cuál interactúan componentes del sistema nervioso central (hipotálamo) y del sistema endocrino, este último compuesto por una glándula principal (hipófisis) y glándulas periféricas (testículos y ovarios). El sistema nervioso central censa las señales que provienen tanto del medio interno como del exterior (fotoperiodo, temperatura, etc.), las que son integradas por neuronas hipotalámicas que, a su vez, liberan factores de liberación o de inhibición que regulan la función de la hipófisis. Hay dos hormonas hipofisarias gonadotróficas que cumplen un rol fundamental en la regulación de la función reproductiva, LH y FSH. Ambas gonadotrofinas LH y FSH son reguladas, entre otros, por un neuropéptido hipotalámico, GnRH. En las gónadas, las gonadotrofinas regulan tanto la producción de gametas (ovocitos o espermatozoides) como la síntesis de las hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos, progestágenos). Por último, las hormonas sexuales tienen diversas funciones, entre ellas, regulan su propia secreción por medio de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa, tanto a nivel hipofisario como hipotalámico.

La estructura de las gonadotrofinas y su papel en la regulación de la función testicular han sido muy estudiados en mamíferos. Sin embargo, en anfibios los trabajos son muy escasos. Casi todos ellos se realizaron en *Lithobates catesbeianus* (Hanaoka y col., 1984; Takada e Ishii, 1984; Takahashi y Hanaoka, 1985; Hayashi y col., 1992a, b), aunque su estructura fue estudiada también en nuestro laboratorio y en el modelo experimental de esta tesis, *R. arenarum* (Volonteri y col., 2013). También se describieron dos gonadotrofinas diferentes, como LH y FSH de mamíferos, en *Lithobates pipiens*, *Bufo japonicus*, *Rana dybowskii*, *Pelophylax nigromaculata*, *Xenopus laevis*, *Pelophylax esculentus* y, como único urodelo, *Cynops pyrrhogaster*

(Itoh y col., 1990; Itoh e Ishii, 1990; Pinelli y col., 1996; Kim y col., 1998; Huang y col., 2001; Saito y col., 2002; Komoike e Ishii, 2003; Zhang y col., 2007).

En anfibios, tal como ocurre en mamíferos, las gonadotrofinas regulan el funcionamiento gonadal y de ellas dependen los procesos que llevan a una reproducción exitosa. Sin embargo, en la actualidad persisten muchas dudas acerca de las funciones que llevan adelante LH y FSH y, sobre todo, si sus receptores poseen la alta especificidad que tienen en mamíferos (Müller y Licht, 1980; Takada y col., 1986; Yamanouchi e Ishii, 1990). En el anuro *L. catesbeianus*, pese a que los receptores parecen no tener tanta especificidad, LH aumenta significativamente la concentración plasmática de andrógenos mientras que FSH no tiene casi efecto (Müller, 1977). Otro ejemplo es el del urodelo *C. pyrrhogaster*, en el cual FSH es fundamental para estimular el pasaje de espermatogonias a espermatocitos primarios en tanto que LH tiene un efecto muy débil (Abé y Ji, 1994). Además, FSH también actúa para preparar las células para el inicio de la meiosis (Yazawa y col., 2002).

En *R. arenarum* dos respuestas testiculares como la espermiación y la esteroidogénesis pueden ser evocadas por ambas gonadotrofinas, LH y FSH, con mayor o menor potencia en una determinada condición experimental, y además, por hCG (Pozzi y Ceballos, 2000; Canosa y Ceballos, 2002a, b; Canosa y col., 2003; Pozzi y col., 2006; Volonteri y Ceballos, 2010).

### El testículo.

En anfibios, los testículos son estructuras pares, alargadas o redondeadas, que se localizan a lo largo de la cara ventral del riñón. Habitualmente son amarillos y varían en la intensidad del color, en el volumen y en la vascularización dependiendo de la edad de los animales así como del estado nutricional y el momento del ciclo reproductivo. El aspecto general del testículo de *R. arenarum* se observa en la figura 1.

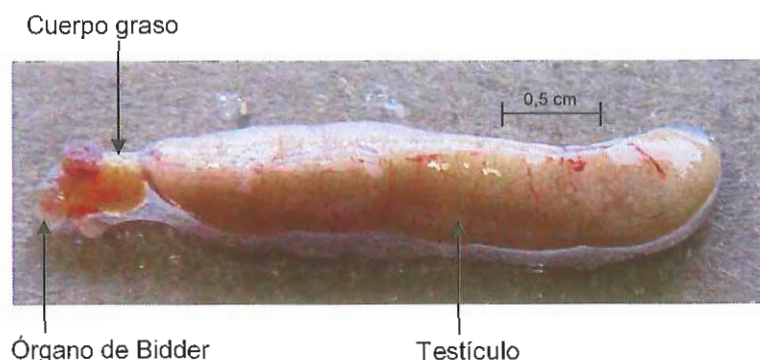


Figura 1: Aspecto general del testículo de *R. arenarum*.

Como en todos los vertebrados, la estructura del testículo se puede dividir en dos compartimentos, el intersticial, compuesto por tejido conectivo, vasos sanguíneos y células de Leydig productoras de hormonas sexuales esteroideas, y el germinal, donde ocurre la espermatogénesis, compuesto por los lóbulos seminíferos que contienen células germinales o espermatogonias, asociadas a células de Sertoli (Pudney, 1998). En los vertebrados anamniotas, dentro de los que se encuentran los anfibios, la unidad funcional de la espermatogénesis es el **espermatocono o cisto, que se forma cuando una espermatogonia es rodeada por las proyecciones citoplasmáticas de células de Sertoli** (Wake, 1969; Lofts, 1974; Duellman y Trueb 1994; Pudney, 1995).

### Espermatogénesis

La espermatogénesis comienza cuando se forma el cisto, lo que ocurre cuando una espermatogonia primaria se asocia con la célula de Sertoli. A partir de ese momento, las espermatogonias se dividen mitóticamente y originan grupos isogénicos de espermatogonias secundarias que continúan rodeadas por las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Sertoli. La organización cística lleva a que las células germinales dentro del cisto se encuentren en la misma etapa de desarrollo aunque esto no ocurre entre los distintos cistos, que pueden estar en estadios diferentes. Casi al final de la espermatogénesis, y cuando comienzan a formarse las espermátidas elongadas, se produce la ruptura de la pared del cisto y las espermátidas elongadas y los espermatozoides adquieren la estructura de "matas de espermatozoides" (Figura 2).

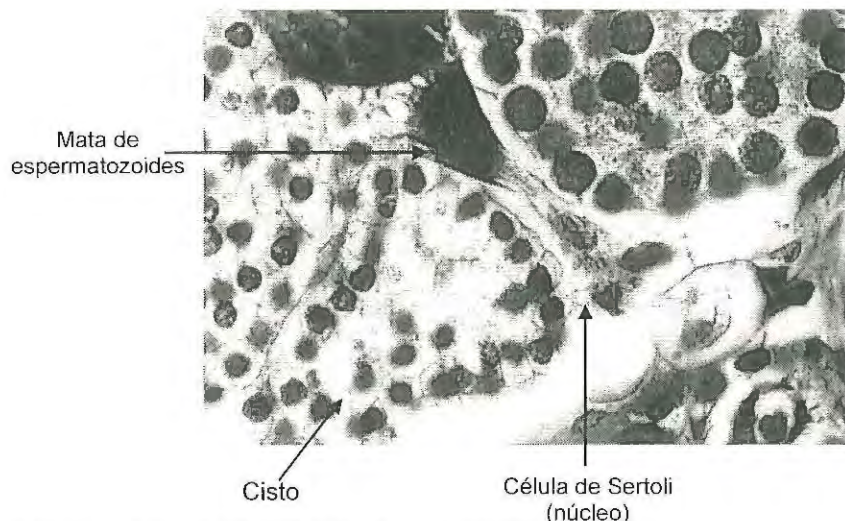


Figura 2: Estructura del testículo de *R. arenarum*.

Con respecto a los ciclos espermatogénicos, en los anfibios se describieron dos tipos, continuo y discontinuo. En un ciclo espermatogénico continuo existen cistos maduros durante todo el año, por lo cual siempre hay presentes grupos de espermatidas y espermatozoides disponibles para ser liberados frente a un estímulo. En un ciclo espermatogénico discontinuo, en cambio, la espermatogénesis comienza tiempo después del apareamiento ocurrido en primavera y finaliza en otoño (Lofts, 1974; 1987; Van Oordt, 1960). Esto implica que en los meses siguientes a la primavera el testículo tendrá un alto número de cistos en distintos estadios de maduración, y en los meses posteriores al otoño poseerá, en su mayoría, cistos maduros y la clásica estructura denominada "matas de espermatozoides".

Para algunos bufónidos, como es el caso de *R. arenarum*, se describió un ciclo espermatogénico continuo. Si bien se encuentran grandes variaciones estacionales y se observan períodos de gran cantidad de matas de espermatozoides nunca habría un verdadero estado de reposo (Burgos y Mancini, 1948). Sin embargo, Scaia y col. (2015, 2016) describieron que si bien durante el período reproductivo el testículo posee, además de gran cantidad de espermatozoides, cistos de espermatocitos y de espermatidas, éstos sufren apoptosis por lo que el nuevo ciclo espermatogénico, que dará lugar a los espermatozoides del siguiente ciclo reproductivo, se inicia después de la época reproductiva a partir de las nuevas espermatogonias. Esto sugeriría que su ciclo espermatogénico es discontinuo.

### Espermiación

Hay una clara distinción en el significado del término espermiación según se hable de

vertebrados mamíferos o no-mamíferos. En el primer caso, la espermiación se refiere a los procesos que conducen a la separación de los espermatozoides de la célula de Sertoli (Pudney, 1998). En el caso de los anamniotas, como por ejemplo los anfibios, la espermiación puede dividirse en dos etapas, la primera es la ruptura de la pared del cisto y la segunda es la separación de los espermatozoides de la célula de Sertoli. La relación temporal entre los dos sucesos difiere según se trate de urodelos o anuros. En los primeros la liberación de los espermatozoides ocurre al mismo tiempo que la ruptura de la pared del cisto en tanto que en los anuros, la liberación de los espermatozoides es un suceso temporalmente posterior a dicha ruptura, como consecuencia pueden observarse espermatozoides anclados a las células de Sertoli por períodos prolongados como se mostrara en la figura 2 (Pudney, 1998).

Como se mencionó, en los anuros la espermiación comienza con la ruptura de la pared del cisto, un evento acompañado por cambios importantes en la citología de las células de Sertoli, y finaliza cuando los espermatozoides son liberados a la luz del lóbulo seminífero y de ahí por el conducto de Wolff o uréter se liberan al exterior (De Robertis y col., 1945; Burgos y Vitale-Calpe, 1967).

En *R. arenarum* la espermiación ocurre como consecuencia del apareamiento en la época reproductiva o bien como respuesta a una dosis de LH o hCG y puede ser inducida *in vitro* por hCG (Pozzi y Ceballos, 2000). Por otra parte, en esta especie la espermiación no está mediada por la síntesis de esteroides en las células de Leydig (Pozzi y Ceballos, 2000) y puede ser evocada con mayor potencia por FSH que por LH en determinada condición experimental (Pozzi y col., 2006). Esto significa que no existiría un factor de naturaleza esteroidea sintetizado por la célula de Leydig que medie la espermiación estimulada por gonadotrofinas. Resultados similares se describieron en *L. catesbeianus* y *Leptodactylus ocellatus* (Rosemblyt y col., 2006). En el bufónido *Bufo japonicus*, se produce un aumento de la concentración plasmática de LH y FSH como consecuencia del amplexo (Ishii e Itoh, 1992). Así, la liberación de los espermatozoides que se produce como consecuencia del amplexo sería consecuencia del aumento de la concentración de LH, de FSH o de ambas.

Volonteri y col. (2010) mostraron, en experimentos *in vitro*, que hCG estimula la espermiación en *R. arenarum* por medio de la activación de la PKA y que PKC no estaría implicada en esa vía, aunque la activación de dicha quinasa disminuye la espermiación estimulada por la gonadotrofina. Además, propusieron que dicha activación regularía la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$  (NKA) implicada en la espermiación. Los estudios realizados sobre la NKA se basaron en investigaciones

realizadas por Russo y Burgos (1969), las cuales sugerían que el tratamiento con hCG provocaba una disminución de la actividad de la NKA y, como consecuencia, un aumento neto de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  y una disminución de la concentración de  $\text{K}^+$  en la célula de Sertoli. Este incremento podría desencadenar el aumento del tamaño de la célula Sertoli, debido a la concomitante entrada de agua en la misma, y su posterior ruptura, liberando a los espermatozoides hacia el lumen lobular. Como resultado de sus trabajos Volonteri y col. (2010) sugirieron que para determinar el rol de la NKA se requieren más experimentos dado que el mecanismo por el cual este complejo de proteínas induce la liberación de espermatozoides parece ser diferente de la actividad de bombeo clásica. Por ello, y para avanzar en el estudio del rol de la NKA en el proceso de espermiación se necesita profundizar en el conocimiento con el que se cuenta sobre la NKA.

#### La $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa

La NKA es una estructura compleja de membrana que cumple distintas funciones en diversos procesos biológicos. Se la conoce principalmente como bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  o bomba de  $\text{Na}^+$ , y en su función utiliza ATP para transportar 3 iones de  $\text{Na}^+$  fuera de las células y 2 iones de  $\text{K}^+$  al interior, en contra de sus respectivos gradientes de concentración. La NKA está compuesta por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y una tercera,  $\gamma$ , que estabiliza la estructura y pertenece a la familia FXYD. Hay cuatro isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) y tres de la subunidad  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ) (Lingrel y Kuntzweiler, 1994; Malik y col. 1996). Las subunidades FXYD agregan diversidad adicional ya que hay siete isoformas de tales proteínas (Clausen y col., 2017).

Las evidencias acumuladas durante muchos años permitieron describir otra función de la NKA, llamada función no canónica. En dicha función se desempeña como transductor de señales (Pierre y Xie, 2006), lo cual representa una función separada de su función de transportador de iones a través de la membrana plasmática.

Distintos trabajos mostraron que hay un pool de NKAs que reside y transmite señales desde las caveolas, microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en colesterol, glicosfingolípidos y esfingomielina, que concentran varios receptores, proteínas quinasas, fosfatasa y proteínas de andamiaje (Liu y col., 2002; Razani y col., 2002). Las caveolinas son proteínas características de las caveolas y una subpoblación de la NKA co-localiza específicamente con una de sus isoformas, la caveolina 1, proteína que se fosforila en tirosina de una manera dependiente de la activación de Scr (Liu y col., 2002; Liu y col., 2003; Wang y col., 2004). La proteína Src es una quinasa de tirosina que no es una proteína receptora (Haas y col., 2002). La

subunidad  $\alpha 1$  de la subpoblación de la NKA localizada en las caveolas forma un complejo funcional con Src (Tian y col., 2006).

Todas las isoformas de la subunidad  $\alpha$  son proteínas transmembrana responsables de las propiedades catalíticas y de transporte de la NKA, así como también de proporcionar sitios de unión para cationes, ATP y esteroides cardiotónicos (CTS). La subunidad  $\beta$  es responsable de la maduración y la inserción de la subunidad  $\alpha$  de la NKA en la membrana plasmática (Geering, 1991; Beguin y col., 1998; Hasler y col., 1998). Una característica importante de la NKA, a diferencia de otras ATPasas, es su capacidad de unir CTS como la ouabaína (inhibidor del transporte de iones de NKA). La naturaleza altamente conservada del sitio de unión a ouabaína de las  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasas en distintas especies sugiere que este juega un papel significativo (Lingrel, 2010). En general, los CTS ejercen sus efectos inhibiendo a la NKA, elevando la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular y, a su vez, aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Blaustein, 1993). Hace ya varios años que las evidencias acumuladas permitieron describir que la unión de CTS a la NKA también se relaciona con la función de señalización anteriormente mencionada. La mayor parte de lo que se sabe sobre los mecanismos de señalización se centra en los estudios de la isoforma  $\alpha 1$ . Algunos estudios *in vitro* sugieren que la unión de ouabaína a la subunidad  $\alpha$  de la NKA provocar la activación de Src asociada a la bomba. Es importante señalar que el efecto de ouabaína sobre Src no depende de la inhibición de la actividad de transporte. Esto es, la inhibición sola no evoca la respuesta dado que el vanadato, un inhibidor de la actividad de ATPasa, carece de efecto sobre Src cuando se utiliza en una concentración que inhibe completamente el transporte de iones (Tian y col., 2006).

La interacción de ouabaína con el complejo NKA/Src llevaría a la transactivación del EGFR que, a su vez, activaría varias vías de señalización (Haas y col., 2002; Yuan y col., 2005). Entre estas vías se puede mencionar la activación de la fosfolipasa C, que lleva a la producción de DAG e  $\text{IP}_3$ , que a su vez pueden, respectivamente, activar varias isoformas de PKC y regular a corto plazo la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Haas y col. 2002; Yuan y col. 2005). Las isoformas de la PKC que pueden ser activadas por DAG y calcio son las conocidas como convencionales,  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\beta$ ,  $\text{PKC}\beta\text{II}$  y  $\text{PKC}\gamma$ , que poseen los dominios C1 y C2 a los que pueden unirse, respectivamente, ambos reguladores. Sin embargo, la familia que agrupa a las PKC es más amplia y está compuesta además por las PKC nóveles,  $\text{PKC}\delta$ ,  $\text{PKC}\epsilon$ ,  $\text{PKC}\eta$  y  $\text{PKC}\theta$ , que requieren solo la unión de DAG ya que carecen del dominio C2 y las PKC atípicas,  $\text{PKC}\zeta$ ,  $\text{PKC}\iota$  y  $\text{PKC}\xi$ , que no son activadas ni por DAG ni por calcio. Además,

todas las isoformas tienen un dominio de pseudosustrato que puede ser utilizado como blanco de inhibidores de PKC (Fleming y Storz, 2017).

La sensibilidad de la NKA a la ouabaína depende no sólo de la subunidad  $\alpha$  que se exprese sino también de la especie. Hace tiempo se describió que dos especies de anfibios anuros, *R. marina* y *L. pipiens* difieren en la sensibilidad a los CTS (Liu y Bentley, 1971). Las diferencias entre las especies mencionadas se reflejaron en la capacidad del esteroide de inhibir *in vitro* el transporte de  $\text{Na}^+$  a través del epitelio vesical de cada especie. *R. marina*, un bufónido, fue menos sensible al inhibidor que *L. pipiens*, un ránido, probablemente debido a las diferencias en la sensibilidad de la NKA presente en la vejiga de cada especie (Morris y col., 1997). Se especuló que esta diferencia en la sensibilidad está relacionada con la presencia de compuestos endógenos similares a los esteroides cardiotónicos que son secretados por las glándulas parotoides en los bufónidos. Los valores de las constantes de inhibición por ouabaína para los distintos tejidos de sapo son, vejiga 100  $\mu\text{M}$ , piel, 1,6 mM, corazón, 100  $\mu\text{M}$  y riñón 35  $\mu\text{M}$ , varios órdenes de magnitud mayores que los valores de  $K_i$  para la inhibición de la NKA de otras especies, que son menores a 1  $\mu\text{M}$  (Morris y col., 1997).

Además, Volonteri y col. (2010) mostraron que la NKA presente en el testículo de *R. arenarum* es sensible a tratamientos con ouabaína en concentraciones iguales o mayores a 100  $\mu\text{M}$ , lo cual genera una marcada disminución de la espermiación estimulada por hCG.

Por otra parte, en dicho trabajo ninguno de los tratamientos realizados afectó la esteroidogénesis estimulada por hCG por lo que se permitieron suponer que la espermiación y la esteroidogénesis estarían reguladas por diferentes mecanismos.

#### Los esteroides testiculares.

Las células de Leydig de los vertebrados tienen características estructurales conservadas aunque difieren en varios aspectos de la esteroidogénesis. De hecho, los productos finales de la síntesis de esteroides son diferentes. En los mamíferos, la testosterona es el andrógeno testicular más importante (Hall, 1994), mientras que en anfibios el predominante es la  $5\alpha$ -DHT (Wada y col., 1976; Müller, 1977, Antila y Saure, 1978; Callard y col., 1978; Kime y Hews, 1978; Moore y col., 1993; Canosa y col., 1998). Sin embargo, *R. arenarum*, como en otros anfibios, también sintetiza derivados reducidos de progesterona (Canosa y col., 1998). La producción de esteroides de 21 átomos de carbono fue descrita además en *R. marina*, *L. catesbeianus* (Kime y Hews, 1978) y *P. nigromaculata* (Kobayashi y col., 1993). A lo

largo del año, *R. arenarum* exhibe un cambio importante en la capacidad esteroideogénica. Los andrógenos son el principal producto testicular sólo en el período no reproductivo. En la época reproductiva (fines de septiembre-mediados de diciembre), la síntesis de andrógenos disminuye significativamente y aumenta la síntesis de progesterona y sus derivados  $3\alpha/5\alpha$  reducidos (Canosa y col., 2003). Esta reducción en la producción de andrógenos, inducida por FSH, es debida a una disminución en la actividad de la enzima Cyp450<sub>c17</sub> (Canosa y Ceballos, 2002a; Fernández Solari y col., 2002).

El aumento en la producción de derivados reducidos de progesterona durante el período reproductivo no se asocia con la espermiación dado que, como mencionamos anteriormente, en el sapo las hormonas esteroideas no están involucradas en la inducción de la espermiación por hCG (Pozzi y Ceballos, 2000; Volonteri y Ceballos, 2010).

Debido a todo lo expuesto se puede concluir que *R. arenarum* presenta un patrón reproductivo disociado de andrógenos ya que los niveles plasmáticos de éstos también disminuyen durante la época de apareamiento (Canosa y Ceballos, 2002b; Denari y Ceballos, 2005). La figura 3 muestra el perfil estacional de la concentración plasmática de testosterona (tomado de Denari y Ceballos, 2005). Las variaciones anuales de testosterona observadas en dicha figura y en los niveles plasmáticos de corticosterona, el glucocorticoide de los anfibios (ver más adelante) permitieron identificar las siguientes etapas en el ciclo reproductivo anual de *R. arenarum*:

- 1) etapa reproductiva, que abarca los meses entre septiembre y diciembre; caracterizado por una baja concentración plasmática de andrógenos y valores elevados de corticosterona.
- 2) etapa post reproductiva, que abarca los meses entre enero y abril y se caracteriza por tener una elevada producción de testosterona y una moderada de corticosterona
- 3) etapa pre reproductiva, entre los meses de mayo y agosto, caracterizada por un importante incremento de la concentración plasmática de testosterona y una disminución de corticosterona.

El análisis de la concentración plasmática de testosterona en función del período reproductivo mostró que el valor mínimo de testosterona en sangre se encuentra en la etapa reproductiva y el máximo en el período pre reproductivo (Denari y Ceballos, 2005).

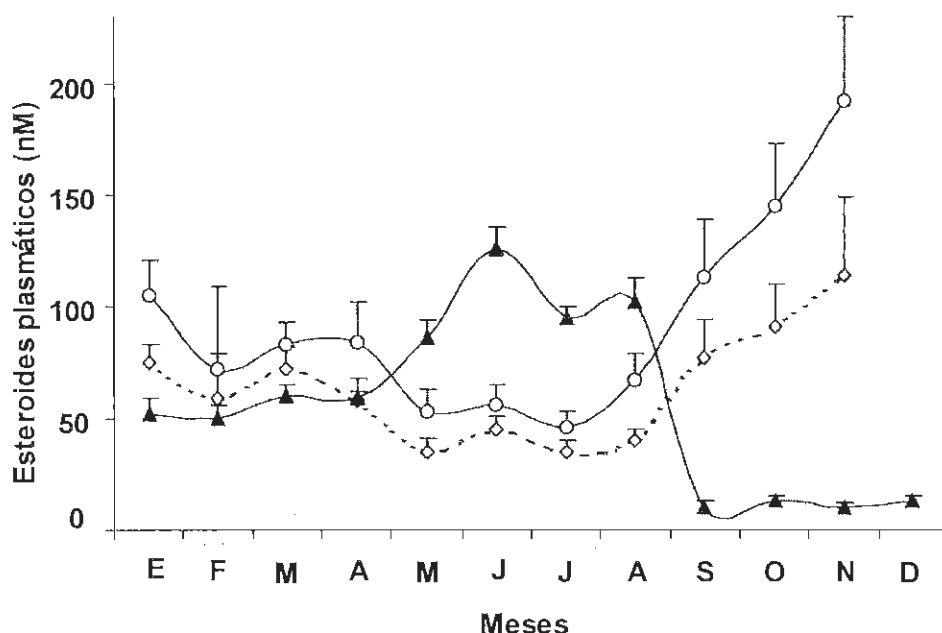


Figura 3: Perfil anual de la concentración plasmática de corticosterona total (O), corticosterona libre (◇) y testosterona total (▲). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  EE. El número de animales varió entre 5 y 8, dependiendo del mes. (Tomado de Denari y Ceballos, 2005)

En el testículo, la transformación de los esteroides de 21 átomos de carbono, como pregnenolona, en andrógenos es catalizada por el Cyp450c17.

#### La proteína STAR y su rol en la esteroidogénesis.

Como ocurre en todos los tejidos esteroidogénicos, el primer paso en la síntesis de esteroides es la transformación de colesterol en pregnenolona catalizada por la enzima Cyp450scc, que se localiza en la membrana interna mitocondrial y es parte del sistema que corta la cadena lateral de colesterol (Farkash y col., 1986). En general el colesterol, de naturaleza no polar, se encuentra en las distintas membranas celulares, estabilizándolas, y en las células que sintetizan esteroides en gotas lipídicas en el citoplasma celular. Si bien las mitocondrias tienen, como todas las organelas, un pool de colesterol en sus membranas, no todo es utilizado para la síntesis de esteroides. Para ello, el precursor debe ser transportado a la membrana interna mitocondrial donde se encuentra la enzima que cataliza el comienzo de la síntesis de los esteroides. Se determinó que este envío es un proceso asistido, es decir, que requiere de un transportador de colesterol. Además, este proceso requiere la síntesis de *ново* de proteínas y es considerado el paso limitante y hormonalmente regulable de la síntesis de esteroides (Haynes y col., 1959; Karaboyas y Koritz; 1965; Jefcoate y col., 1986, 1987). El descubrimiento y la caracterización de la proteína involucrada en dicho

paso fue el objetivo de varios laboratorios y durante muchos años surgieron distintas proteínas candidatas para ser el regulador agudo de la esteroidogénesis. Estos candidatos incluyeron la proteína transportadora de esteroides 2 (SCP2) (Vahouny y col., 1987), el polipéptido activador de esteroidogénesis (Pedersen y Brownie, 1983, 1987), el receptor de periférico benzodiazepina/proteína translocadora (PBR/TSPO) (Gavish y col., 1999) y la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis, StAR, por sus siglas en inglés (Clark y col., 1994) y todos fueron candidatos a ser la proteína responsable de la regulación aguda de la transferencia de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Para una revisión ver Stocco y col. 2017).

En mamíferos, el paso mencionado está ampliamente estudiado y se considera que StAR posee las características necesarias para cumplir con el rol del regulador agudo (Stocco y Sodeman, 1991; Clark y col., 1994). Además, la idea de que la proteína StAR cumple un papel indispensable en la esteroidogénesis proviene principalmente de las observaciones de que las mutaciones en el gen StAR en humanos resultan en la inhabilidad casi completa de esos individuos para sintetizar esteroides y del hecho de que los ratones StAR *null* tienen esencialmente el mismo fenotipo que se ve en la patología humana Hiperplasia Suprarrenal Congénita Lipóide (CLAH) (Lin y col., 1995; Caron y col., 1997). Una revisión reciente proporciona un resumen de las mutaciones en StAR que se habían descubierto hasta ese momento (Miller, 2016).

En la regulación de la biosíntesis de los esteroides también se mostró que se requieren eventos dependientes de la fosforilación por proteínas quinasas. La principal quinasa reguladora de este proceso, entre los vertebrados estudiados, es la PKA. Sin embargo, se documentaron muchas otras vías independientes de AMPc. La participación de otras quinasas tales como la PKC, proteínas quinasas dependientes de calcio-calmodulina y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y factores tales como metabolitos de ácido araquidónico, factores de crecimiento, ión cloruro, entre otros, también se describieron y sus funciones pueden ser distintas según la vía esteroidogénica o la especie que se estudie (Cooke, 1999; Stocco y col., 2005).

StAR es una proteína cuyo precursor tiene un peso molecular de 37 kDa y la proteína madura de 30 kDa. En la secuencia de StAR de humanos y murinos se identificaron dos sitios separados de fosforilación por PKA, serina 56/57 y serina 194/195. Cuando se mutan estos sitios disminuye la funcionalidad de StAR y la esteroidogénesis sólo cuando el sitio afectado es serina 194/195. (Arakane y col., 1997).

Los trabajos de StAR en vertebrados no mamíferos son escasos y dispersos en cuanto a la metodología de estudio, pero en aquellos donde se realiza la caracterización muestran que StAR parece estar fuertemente conservada entre los vertebrados. Dentro de los trabajos en vertebrados no mamíferos podemos citar trabajos en peces (Kusakabe y col., 2002; Kusakabe y col., 2009; Evans y Nunez, 2010), aves (Bauer y col., 2000; Johnson y col., 2002) y anfibios (Bauer y col., 2000; Maruo y col., 2008; Kim y col., 2009; Paden y col., 2010; Santillo y col. 2017).

### El órgano de Bidder

Como ya se mencionara, una de las características de la familia Bufonidae es la presencia, en el extremo anterior de cada testículo, del órgano de Bidder (OB) (Lamotte y col., 1973), que es par y similar a un ovario inmaduro con oocitos en estadios previtelogénicos y vitelogénicos tempranos (Scaia y col., 2011). Exhibe una gran variabilidad en cuanto a su tamaño, entre individuos y, también, a lo largo del año (Scaia y col., 2011).

### Los esteroides del órgano de Bidder

Si bien la función del órgano de Bidder no es muy clara, en nuestro laboratorio se encontró que en *R. arenarum* dicho órgano es esteroidogénico y expresa las enzimas Cyp450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD/I, CypP450<sub>c17</sub> y aromatasa (Scaia y col., 2011). Además, sintetiza estradiol como uno de sus productos finales, siendo uno de los principales sitios de producción de estrógenos en los machos de esta especie (Scaia y col., 2013), que no expresa aromatasa en el testículo (Canosa y col., 1998). Por otro lado, la castración de machos de la especie *Duttaphrynus melanostictus* provoca un aumento del número de folículos y del peso del órgano de Bidder durante la etapa reproductiva (Ghosh y col., 1990), aunque si se remueve la hipófisis junto con los testículos los parámetros mencionados disminuyen y este efecto es revertido por la administración de la hormona luteinizante (LH), sugiriendo la acción de LH en la regulación del desarrollo del órgano de Bidder. Por su parte, Pancak-Roessler y Norris (1991) demostraron que en *Anaxyrus woodhousii* la administración de hCG aumenta la síntesis de estradiol por el OB, y el desarrollo de un rudimento de oviducto, sugiriendo que el OB posee receptores para gonadotrofinas.

Además de andrógenos y derivados de progesterona, en individuos post metamórficos de algunas especies de la familia Ranidae, entre ellas *P. esculentus*, se han registrado altos niveles de estradiol plasmático, que a diferencia de *R. arenarum* se sintetiza en el testículo (Fasano y col., 1989; Polzonetti-Magni y col., 1984). En *R. arenarum* también

se midió estradiol en circulación aunque no se sintetiza en el testículo sino en el órgano de Bidder, tal como se mencionara en párrafos anteriores (Scaia y col., 2011; 2013).

La figura 4 muestra las variaciones anuales en la concentración plasmática de estradiol. Scaia y col. (2013) observaron que el perfil anual de dicha hormona es contrario al de testosterona, encontrándose los máximos valores en los meses de primavera verano y los mínimos durante el invierno. Los autores concluyen que la mínima concentración de estradiol plasmático se encuentra en el período pre reproductivo mientras que en los períodos reproductivo y post reproductivo no hay diferencias significativas (Figura 4).

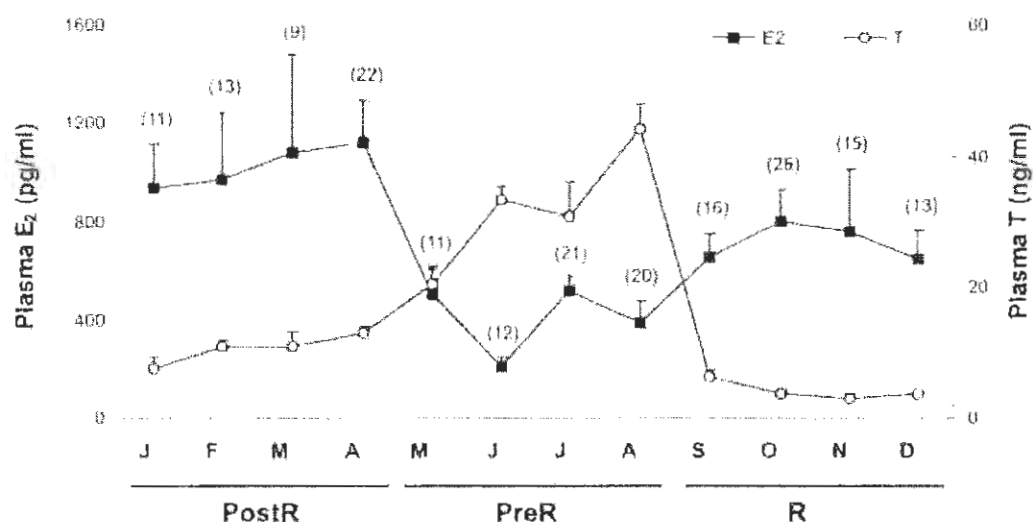


Figura 4: Variaciones anuales de los niveles plasmáticos de estradiol (E<sub>2</sub>) y testosterona (T). El número de animales capturados en cada mes se indica entre paréntesis. Los valores de estradiol están expresados como pg de hormona por ml de plasma, mientras que los valores de testosterona están expresados como ng de hormona por ml de plasma. Cada punto de la curva representa el promedio  $\pm$  EE (Tomado de Scaia y col., 2013).

Una de las preguntas que surgió de esos estudios fue cuál es el rol fisiológico de las variaciones estacionales en la concentración plasmática de estradiol. Scaia y col. (2018) propusieron que el aumento en los niveles de estradiol en el período post-reproductivo podría inducir la apoptosis de los cistos que avanzaron en su desarrollo pero que no fueron espermiados sin afectar la proliferación espermatogonial.

## La glándula adrenal/interrenal

En los mamíferos, las glándulas adrenales son estructuras compactas localizadas en el polo anterior del riñón y están compuestas por dos tejidos glandulares funcional y embriológicamente no relacionados. La médula, que constituye la parte central de la glándula, deriva de las células de la cresta neural de origen neuroectodérmico mientras que la corteza, que es la capa más externa, deriva del tejido mesodérmico. La médula adrenal está formada por células cromafines que producen las catecolaminas adrenalina y noradrenalina mientras que la corteza adrenal corresponde a la parte esteroideogénica de la glándula (Chester-Jones, 1957). A su vez, la corteza se divide en capas morfológica y funcionalmente diferenciadas. La zona glomerulosa, la más externa de todas, sintetiza aldosterona, la zona intermedia denominada fasciculata produce GC y la zona reticularis, que está en contacto con la médula, secreta GC y hormonas sexuales.

En anfibios anuros en general (Chester-Jones, 1957) y en *R. arenarum* en particular (Fustinoni y Porto, 1938), las glándulas interrenales son equivalentes, funcionalmente, a las glándulas adrenales de mamíferos. Las interrenales tienen aspecto acintado, son de color amarillo intenso y están localizadas en la cara ventral de los riñones mesonéfricos. La glándula está constituida por trabéculas celulares que invaden el tejido renal en toda su longitud. Los estudios de ultraestructura microscópica realizados en *R. arenarum* muestran que los cordones están formados por dos tipos celulares diferenciados, las células corticales y las células cromafines (Piezzi y Burgos, 1968; Regueira y col., 2013a). El tipo cortical es el más abundante y es el que puede ser comparado con las células corticales de la glándula de los mamíferos. Por otra parte, la glándula interrenal de anfibios no presenta ningún tipo de zonación morfológica evidente, a diferencia de lo que ocurre con la glándula de los mamíferos. Estudios de nuestro laboratorio mostraron que la glándula interrenal de *R. arenarum* está formada por células esteroideogénicas con distinta capacidad para sintetizar corticosterona. Los distintos tipos celulares tienen una regionalización específica en la glándula, tal que las células que producen menor cantidad de corticosterona se ubican en la zona más interna de la glándula y su número disminuye hacia la parte posterior de la misma (Regueira y col., 2013a). Al igual que lo que ocurre en *L. catesbeianus* (Varma, 1977) se desconoce si las células que sintetizan menor cantidad de corticosterona son células con menor grado de actividad biosintética o si son productoras de aldosterona.

## Los esteroides adrenales

En los mamíferos, el cortisol y la corticosterona son hormonas esteroideas que tienen

función glucocorticoidea. Su síntesis y secreción se encuentran bajo el control de la hormona hipofisaria adrenocorticotrofina (ACTH), que es secretada, a su vez, en respuesta a CRH, neurohormona de origen hipotalámico. El nivel basal de secreción de glucocorticoides (GC) está regulado mediante la retroalimentación negativa ejercida por dichas hormonas sobre las células secretoras de CRH y ACTH. Por otra parte, la secreción basal de GC está sometida a un ritmo diario, resultado de la variación cíclica en la secreción de CRH que parece estar controlada por un reloj biológico endógeno. Además, existen cambios en la sensibilidad de la glándula adrenal a ACTH, siendo mayor en los momentos en que se registran los picos diarios de GC (Gorbman y col., 1983).

Al igual que en los mamíferos, en los anfibios la glándula interrenal es la fuente de GC y de mineralocorticoides. En *R. arenarum*, al igual que en otros anfibios, corticosterona es el principal GC y el balance salino está a cargo de aldosterona (Ceballos y col., 1983). En los anfibios, así como en los mamíferos, los GC elevan la concentración plasmática de glucosa y tienden a aumentar los niveles de glucógeno en hígado y músculo (Gorbman y col., 1983). Por su parte, los mineralocorticoides son importantes en la regulación del intercambio de  $\text{Na}^+$  por la piel ventral y la vejiga urinaria (Crabbé, 1961). En *R. arenarum*, un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  plasmático provoca una caída en la producción y consecuente liberación de aldosterona, sin modificar los niveles de corticosterona (Pozzi y col., 2002). En otras palabras, en esta especie, como ocurre en los mamíferos, la regulación de ambos esteroides estaría disociada.

### El estrés

La secreción adrenal de GC es activada por una gran variedad de estímulos, incluyendo hemorragias, enfermedades infecciosas, exposición a agentes contaminantes, falta de oxígeno, etc. En la actualidad el estrés se define como la incapacidad de un animal de enfrentar exitosamente al medio ambiente. Este fenómeno se evidencia en la falta de desarrollo de todo su potencial genético en cuanto a, por ejemplo, la tasa de crecimiento, la resistencia a las enfermedades y/o la fertilidad (Dobson y Smith, 2000). A pesar de esto, en los vertebrados, la respuesta fisiológica al estrés ayuda al animal a enfrentar con éxito, desde el punto de vista de la supervivencia, los estímulos nocivos. Un componente de dicha respuesta es la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), que culmina con la liberación de GC varios minutos después del inicio del estímulo estresante. Una vez secretados, los GC producen cambios fisiológicos y comportamentales que ayudan al animal a responder adecuadamente a dicha situación. Sin embargo, se sabe poco acerca de

cómo elevadas concentraciones de GC ayudan en la supervivencia (Romero, 2002; Moore and Jessop, 2003). Por otra parte, si bien los GC juegan un papel crítico en la mediación de la adaptación homeostática al estrés (Munck y col., 1984; Reul y col., 1990; McEwen, 1998), la sobreactividad crónica del eje HPA que se observa durante situaciones de estrés prolongado y severo tiene consecuencias negativas, particularmente para los sistemas nervioso central, inmune y reproductivo (Rabin y col., 1988; Sapolsky y col., 1990; McEwen, 1998; Chand y Lovejoy, 2011).

### Los glucocorticoides

En la segunda mitad del siglo pasado, los GC pasaron de ser los responsables de activar sistemas necesarios para enfrentar situaciones de estrés a ser también los causantes de apagar estos sistemas. Al hacerlo, protegen al organismo de los efectos fisiológicos disparados por el estrés que, de otro modo, resultarían perjudiciales (Sapolsky y col., 2000).

El aumento en la secreción de GC es considerado como una respuesta obligatoria a los estímulos nocivos, y la mayoría de los órganos y sistemas biológicos son sensibles a dicho incremento. La función fisiológica del aumento de la concentración plasmática de los GC no es proteger de la fuente de estrés misma, sino proteger de las reacciones de defensa normales que son activadas por el estrés. Los GC llevan a cabo su función apagando las reacciones de defensa, previniendo de ese modo, que se activen de manera excesiva amenazando la homeostasis (Munck y col., 1984). En otras palabras, los GC limitan la respuesta al estrés y contribuyen a la recuperación a partir de la misma.

Las concentraciones de GC basal y de estrés pueden tener efectos fisiológicos muy diferentes. De hecho, muchos efectos permisivos tienen lugar, generalmente, con concentraciones bajas de GC y mediante el receptor tipo I mientras que los efectos estimulatorios, supresores y preparativos se activan con concentraciones elevadas mediante el receptor tipo II. En los mamíferos, uno de los aspectos más afectados por las concentraciones elevadas de GC es el de la reproducción (Sapolsky, 1985; Sapolsky y col., 2000; Wingfield y Sapolsky, 2003; Hardy y col., 2005; Xiao y col., 2010; Ing y col., 2014; Lin y col., 2014; Witorsch, 2016; Whirledge y Cidlowski, 2017). Numerosos trabajos demostraron que las células de Leydig son el principal blanco de la acción de los GCs en el testículo (Bambino and Hsueh, 1981; Welsh y col., 1982; Monder y col., 1994a; Monder y col., 1994b; Hardy y col., 2005; Hu y col., 2008; Orr y Mann, 1992). En dichas células, la inhibición de la esteroidogénesis provocada por los GCs se debe a la interacción con el GR aunque también a efectos no genómicos

(Dong y col., 2004; Hu y col., 2008).

En animales silvestres también se observan variaciones en las concentraciones de GCs. Factores ambientales, estatus social y perturbaciones físicas como la persecución por parte de un predador pueden arriesgar su propia supervivencia, así como también su reproducción (Moore y Jessop, 2003). A pesar de esto, la respuesta al estrés también ayuda al animal a protegerse de los estímulos nocivos que encuentra a su alrededor.

Numerosos estudios demostraron que en los anfibios las concentraciones de GC basal e inducidas por estrés varían a lo largo del año (Romero, 2002). En dicho grupo, la concentración de GC es mayor en la época de apareamiento que en otros momentos del año, aumento que no se observa en mamíferos (Romero, 2002; Denari y Ceballos, 2005; Dickens y Romero, 2013; Madelaire y Gomes, 2016; Narayan y col., 2016). Por otra parte, un aumento de GC tiene efectos agudos sobre aspectos reproductivos, entre ellos el comportamiento (Leary y Crocker-Buta, 2018)

El fotoperiodo es uno de los factores exógenos más importantes en la regulación de la reproducción. Sin embargo, en los anfibios los cambios de temperatura son aún más importantes ya que la actividad metabólica depende de la temperatura de su cuerpo y ésta a su vez depende de la ambiental (Paniagua y col., 1990). De hecho, el principal factor externo que regula el ciclo reproductivo en anfibios y en reptiles parece ser la temperatura ambiente (Paniagua y col., 1990).

En los últimos años, se llevaron a cabo muchos estudios acerca de la variación anual en la concentración plasmática de GC. Si se tienen en cuenta los anfibios, es claro que en la mayoría de las especies estudiadas los niveles plasmáticos de GC, tanto basales como inducidos por estrés, varían a lo largo del año. En los anfibios, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, es posible distinguir un claro aumento de la concentración basal de GC en la época reproductiva. En el caso de las variaciones estacionales de los niveles de estrés no hay un patrón claro o no se cuenta con suficientes trabajos como para concluir al respecto. Por otra parte, tampoco se conoce hasta el momento el modo en que se regula estacionalmente la secreción de GC (fotoperiodo, temperatura, disponibilidad de alimento) ni el valor adaptativo que tendrían estas fluctuaciones (Romero, 2002; Breuner y col., 2008).

### El receptor de glucocorticoides

Los GC modulan una gran variedad de procesos fisiológicos y comportamentales mediante la interacción con por lo menos tres sitios de unión diferentes. Los GC

pueden unirse a receptores de membrana plasmática en diversas especies (Orchinik y col., 1991; Borski, 2000; Evans y col., 2000; Gasser y Orchinik, 2000; Orchinik y col., 2000; Breuner y Orchinik, 2009; Evanson y col., 2010; Jiang y col., 2014) o pueden hacerlo a receptores intracelulares. En los mamíferos se han identificado dos receptores citosólicos para los esteroides adrenales, el receptor tipo I MR y el tipo II o GR (Veldhuis y col., 1982; de Kloet y col., 1993). El MR y el GR son miembros de una familia de receptores de esteroides que se caracteriza por poseer una alta homología de secuencia dentro de los dominios de unión al esteroide y al ADN, y actúan como factores de transcripción ligando-dependiente regulando la expresión de genes específicos (McEwen y col., 1986; Evans, 1988). El receptor de tipo I o MR une aldosterona y glucocorticoides con una alta y similar afinidad (Veldhuis y col., 1982; Beaumont y Fanestil, 1983; Krozowski y Funder, 1983; Arriza y col., 1987; Funder y col., 1988; Rupprecht y col., 1993). El receptor de tipo II o GR, posee una afinidad menor por los GC que el de tipo I pero posee especificidad por estas hormonas y no une aldosterona (Veldhuis y col., 1982).

Dentro de los anamniotas, en *X. laevis* se clonó un receptor con alta similitud de secuencia con el MR de rata y humano (Csikos y col., 1995). Sin embargo, no está claro si los niveles fisiológicos de expresión del mismo son tales como para que resulte funcional. Además, el efecto mineralocorticoideo de aldosterona y corticosterona sobre el transporte de Na<sup>+</sup> en las células del riñón parece estar mediado por el receptor tipo II ya que el flujo iónico se bloquea con la administración de RU486 mientras que no ocurre con un antagonista del receptor tipo I de mamíferos (Schmidt y col., 1993). Por otra parte, en la trucha *Oncorhynchus mykiss* se clonó el MR y no se detectó aldosterona en plasma, por lo que cortisol sería el esteroide que se une a este receptor (Colombe y col., 2000). Los autores especulan que evolutivamente podría haber surgido en primer lugar la función mineralocorticoidea mediada por este receptor y luego aldosterona como mineralocorticoide.

En el caso de *R. arenarum*, la función mineralocorticoidea parece ser ejercida sólo por aldosterona (Ceballos y col., 1983; Pozzi y col., 2002); permitiendo especular con la existencia de dos receptores funcionalmente distintos como ocurre en los mamíferos. En el testículo de esta especie se detectó la presencia del receptor tipo II pero no del tipo I, sugiriendo que al igual que en mamíferos los GC podrían modular/regular la función testicular (Denari y Ceballos, 2006). Por otra parte, se describieron receptores intracelulares en otros anfibios y en diversos órganos y tejidos como hígado, riñón y piel (Lange and Hanke, 1988; Lange y col., 1989; Orchinik y col., 2000; Denari and Ceballos, 2006; Regueira y col., 2013b).

### La enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La enzima 11 $\beta$ -HSD cataliza la interconversión de GC activos (cortisol, corticosterona) en sus formas inactivas (cortisona, 11-dehidrocorticosterona). A pesar de estar presente en varios tejidos, fue su expresión en riñón la que le confirió su rol clásico, siendo éste el de otorgar especificidad al MR renal. Al inactivar rápidamente los GC, la 11 $\beta$ -HSD impide la unión de los mismos al MR, permitiendo la unión de aldosterona a su receptor (Edwards y col., 1988; Funder y col., 1988; Funder, 1989). Por otra parte, como los GC una vez oxidados tampoco pueden unirse al GR, esta enzima puede modular el acceso de los GC a su propio receptor mediante el control de los niveles intracelulares de GC capaces de unirse al mismo (Seckl y Brown, 1994; Sheppard, 1998; Seckl y Walker, 2001). Entonces, la 11 $\beta$ -HSD determina la concentración de GC fisiológicamente activos en el interior de la célula regulando, de este modo, el acceso de los GC a MR y GR *in vivo* (Monder y White, 1993). En otras palabras, la acción de los GC y de aldosterona en un determinado tejido no depende solamente de la presencia de GR y MR sino también de la expresión de la enzima 11 $\beta$ -HSD.

Hasta el momento se han descrito dos isoformas de la enzima en mamíferos. La 11 $\beta$ -HSD1 se localiza en el retículo endoplásmico liso (REL) y su cofactor es el NADP(H) (Monder y White, 1993). La afinidad de esta isoforma por cortisol y corticosterona está en el rango micromolar (Agarwal y col., 1989; Monder y col., 1991) y, por otra parte, es relativamente insensible a la inhibición por ácido glicirretínico (Monder y col., 1991; Monder y col., 1994a; Yang y Yu, 1994). La 11 $\beta$ -HSD2 se localiza también en el REL (Brown y col., 1993), es NAD<sup>+</sup>-dependiente, y su afinidad por cortisol y corticosterona está en el orden del nanomolar (Mercer y Krosowski, 1992). Esta isoforma funciona esencialmente como una 11 $\beta$ -deshidrogenasa unidireccional (Agarwal y col., 1994; Albiston y col., 1994; Naray-Fejes-Toth y Fejes-Toth, 1995; Zhou y col., 1995). Por otra parte, está sujeta a una fuerte inhibición por producto final y por ácido glicirretínico (Rusvai y Naray-Fejes-Toth, 1993; Yang y Yu, 1994).

En cuanto a los anfibios, en la vejiga urinaria de *R. marina* se detectó la actividad de una isoforma de la 11 $\beta$ -HSD con características similares a la 11 $\beta$ -HSD2 descrita en el riñón de los mamíferos. La misma posee una clara preferencia por NAD<sup>+</sup> como cofactor, tiene una afinidad por corticosterona en el rango nanomolar y presenta una actividad de deshidrogenasa unidireccional (Brem y col., 1991, 1993). Asimismo, se inhibe por carbenoxolona, lo cual provoca en dicho tejido un aumento en el transporte transepitelial de Na<sup>+</sup> inducido por GC (Brem y col., 1989). Por otra parte, también se describió actividad de esta enzima en el testículo de *R. arenarum* (Denari y Ceballos,

2005), con características similares a la enzima tipo II de mamíferos. En esta especie también se estudiaron las variaciones estacionales en la actividad enzimática. Los resultados mostraron que el  $K_m$  de la enzima, en el alrededor de los 200 nM, es constante durante el año pero la actividad aumenta durante el período post-reproductivo. Dado que los valores plasmáticos de corticosterona basal durante los tres períodos reproductivos son cercanos al  $K_m$  de la enzima 11 $\beta$ -HSD, esta enzima podría jugar un rol fundamental en la inactivación de los GCs circulantes disminuyendo el efecto de la corticosterona en el testículo. La observación de que existen variaciones estacionales de la actividad enzimática sugiere que la expresión de esta enzima está regulada por factores que también fluctúan estacionalmente y que modularían el rol de la 11 $\beta$ -HSD en el testículo.

Además, en *R. arenarum*, al igual que en mamíferos, la enzima co-localiza con el receptor en las células de Leydig (Schultz y col., 1993; Denari y Ceballos, 2006), que son el blanco principal de los GC en el testículo (Stalker y col., 1989). En los mamíferos, los GC inhiben la producción de testosterona en estas células (Cumming y col., 1983; Cooke y col., 1992; Monder y col., 1994c; Hardy y Ganjam, 1997). Esta inhibición es mediada por el GR (Bambino y Hsueh, 1981; Monder y col., 1994a) y es independiente de los niveles circulantes de LH (Gao y col., 1996; Gao y col., 2002). En las células de Leydig, altas concentraciones de GC suprimen la producción de testosterona mediante la inhibición de la expresión de enzimas esteroideogénicas (Welsh y col., 1982; Hales y Payne, 1989; Payne y Sha, 1991; Orr y col., 1994). Además, inhiben la expresión del receptor de LH (Bambino y Hsueh, 1981) y estimulan la apoptosis de las células de Leydig inmaduras y maduras (Gao y col., 2002). Sin embargo, se sugiere que dentro de cierto rango de concentraciones la enzima 11 $\beta$ -HSD protege al testículo del efecto negativo que ejercen los GC (Phillips y col., 1989; Gao y col., 1996). En rata, el testículo es uno de los tejidos que presenta mayor actividad de 11 $\beta$ -HSD, asociada exclusivamente con las células de Leydig (Phillips y col., 1989; Monder y col., 1994b). De modo que el papel testicular de la enzima sería regular la producción de testosterona mediante el ajuste de la concentración intracelular de GC. Esta hipótesis está avalada por el hecho que la inhibición de la actividad de la 11 $\beta$ -HSD en las células de Leydig potencia la supresión causada por corticosterona sobre la síntesis de testosterona (Monder y col., 1994a, 1994b) y que las células de Leydig adultas expresan 11 $\beta$ -HSD con actividad oxidativa (Phillips y col., 1989; Monder y col., 1994b).

A partir de todo lo expuesto, se pone de manifiesto que no es posible extrapolar los

cambios, a lo largo del año, en la concentración plasmática de los GC a las variaciones anuales en la magnitud de sus efectos fisiológicos. Esto último se debe a que la acción de los GC puede ser modulada a otros niveles, distintos de la cantidad de hormona en plasma. La CBG transporta GC en plasma y regula la biodisponibilidad y vida media de los mismos, ya que sólo los esteroides libres son considerados como disponibles para difundir a los tejidos blanco (Rosner, 1990). De modo que cambios en los parámetros de unión (afinidad, capacidad) de estas proteínas podrían compensar las variaciones estacionales en la concentración plasmática de GC. De hecho, se encontró en aves que la CBG presenta cambios estacionales en su capacidad estando ésta modulada por la testosterona gonadal, esteroide que también se une a CBG en esta especie (Deviche y col., 2001). Otra potencial fuente de compensación es el cambio a lo largo del año en la sensibilidad de los tejidos blanco. En este caso, las variaciones podrían darse en los parámetros de unión del GR, en las cantidades relativas de GR y MR o en la cantidad de la enzima  $11\beta$ -HSD, que activa o inactiva GC localmente. Cualquiera de estos cambios puede, potencialmente, llevar a que la variación anual de GC plasmáticos pierda su significado fisiológico. Por esto, los trabajos dirigidos al estudio de las variaciones estacionales en todos estos parámetros son vitales para entender las consecuencias fisiológicas del ritmo anual de GC (Romero, 2002).

Lo expuesto hasta aquí, muestra la escasa información con la que se cuenta aún acerca de la regulación de la esteroidogénesis y la espermiación en anfibios y las discrepancias que pueden encontrarse entre diversos trabajos. Como consecuencia de ello se desprenden los objetivos a desarrollar en la presente tesis, que se detallan en la próxima sección.

## II Objetivos e Hipótesis

## Objetivos e Hipótesis

A partir de los antecedentes mencionados para los vertebrados en general, y *R. arenarum* en particular, surge el objetivo general de esta tesis que es caracterizar y evaluar el rol de distintos factores que intervienen en la regulación de la esteroidogénesis y la espermiación.

La hipótesis general de trabajo es que en los machos de *R. arenarum* la espermiación y la síntesis de esteroides son procesos regulados independientemente.

Para llevar a cabo el objetivo principal la tesis está organizada en tres partes:

### Capítulo I

#### Objetivo general

Estudiar la regulación de la espermiación y la esteroidogénesis en cuanto a la participación de la NKA y la activación de PKA.

##### Objetivos específicos:

Estudiar el rol de la NKA en la espermiación estimulada por hCG.

Analizar la interacción entre la PKC y un inhibidor de la NKA como la ouabaína en la regulación de la espermiación estimulada por hCG.

Estudiar la participación de PKA en la vía de señalización estimulada por FSH, en la espermiación y en la esteroidogénesis.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos que se ponen a prueba en este capítulo son:

La espermiación estimulada por hCG involucra la acción no canónica de la NKA.

La acción inhibitoria de ouabaína sobre la espermiación involucra la activación de PKC.

El mecanismo de acción de FSH para estimular la espermiación y la esteroidogénesis es similar al de hCG.

### Capítulo II

#### Objetivo general

Profundizar los estudios de la regulación de la esteroidogénesis testicular.

##### Objetivos específicos:

Analizar el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de andrógenos y la expresión de la proteína StAR.

Estudiar la participación de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en la modulación del efecto glucocorticoideo.

Analizar el efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre la expresión de la proteína StAR y la síntesis de andrógenos.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos que se ponen a prueba en este capítulo son:

Los glucocorticoides disminuyen la síntesis de andrógenos al inhibir la expresión de la proteína StAR.

La enzima 11 $\beta$ -HSD inhibe la acción de los glucocorticoides.

Tanto hCG como 8-Br-AMPC estimulan la síntesis de andrógenos al aumentar la expresión de la proteína StAR.

### Capítulo III

#### Objetivo general

Caracterizar la estructura molecular y estudiar la regulación del ARN mensajero de la proteína StAR de testículo.

#### Objetivos específicos

Caracterizar la secuencia completa de la proteína StAR.

Evaluar las relaciones filogenéticas a partir de las secuencias aminoacídicas de la proteína StAR y la magnitud del componente filogenético en la variabilidad de la secuencia.

Evaluar el efecto del tratamiento con hCG y 8-Br-AMPC sobre la expresión del ARNm de StAR.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos que se ponen a prueba en este capítulo son:

La secuencia de la proteína StAR en *R. arenarum* está altamente conservada en comparación con las de otros vertebrados.

Tanto hCG como 8-Br-AMPC estimulan la expresión del ARNm de StAR.

## Apéndice. Soluciones y Buffers

- 1) Agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC): agua destilada, 0,1% v/v DEPC.
- 2) Medio de cultivo L-15 estéril (de Leibovitz, Sigma-Aldrich, EEUU) con el agregado de 10 mM Hepes, antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina), antimicótico (0,25 mg/ml de anfotericina B) y glucosa 60mM, pH 7,4. Para tratamientos de 24 horas el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino. Este último fue previamente inactivado a 55°C durante una hora y tratado con una mezcla de carbón:dextrano (2%:0,2%, p/v) para eliminar los esteroides.
- 3) Medio Krebs Ringer Glucosa Hepes (KRGH): NaCl 0,9% p/v, KCl 1,15% p/v,  $\text{CaCl}_2$  1,22% p/v,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,11% p/v,  $\text{MgSO}_4$  heptahidratado 3,8% p/v, glucosa 5,4% p/v, Hepes 0,026 M; pH= 7,4.
- 4) Buffer de homogenización: 0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 0,4 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA, pH 7,4.
- 5) Buffer de revelado: 1,25 mM luminol, 0,198 mM ácido cumárico, 0,038% v/v peróxido de hidrógeno (100 volúmenes) en 100 mM de buffer Tris-HCl, pH 8,0.
- 6) Buffer de siembra: 40 mM Tris-HCl, 2% p/v dodecilsulfato sódico, 4% v/v glicerol, 0,001% p/v azul de bromofenol, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,8.
- 7) Buffer fosfato:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  81 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  19 mM, pH: 7,4.
- 8) Buffer fosfato salino (PBS): buffer fosfato 10mM, NaCl 140 mM, pH: 7,4.
- 9) Buffer RIA: PBS, 0,1% gelatina, 20 mM EDTA, 0,1% azida sódica, pH 7,4.
- 10) Buffer TAE: Tris-Cl 0,04 M, EDTA 0,01 M; pH= 8.
- 11) PBS-T: Buffer fosfato salino 10 mM, tween 20 0,5 % v/v.

## Abreviaturas

- 11 $\beta$ -HSD: 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  
3 $\beta$ -HSD/I: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa  
5 $\alpha$ -DHT: 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona  
8-Br-AMPc: 8-Bromo adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ACTH: adrenocorticotrofina  
AG: ácido glicirretínico  
Bi: bisindolmaleimida  
BLAST: del inglés, Basic Local Alignment Search Tool  
BLOSUM (BLOCKs of Amino Acid SUBstitution Matrix  
CLAH: Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia (HACL)  
CRH: hormona liberadora de ACTH  
CT: del inglés, cycle threshold  
Cyp450scc: citocromo P450 colesterol desmolasa  
CypP450<sub>c17</sub> = Citocromo P450, 17-hidroxilasa, 17-20 liasa.  
DAG diacilglicerol  
DEPC: dietilpirocarbonato  
EGFR: del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor  
ExPASy: del inglés, Expert Protein Analysis System  
FSH: hormona folículo estimulante  
FSHrh: FSH recombinante humana  
GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa  
GC: glucocorticoides  
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas  
GR: Receptor de Glucocorticoides o tipo 2  
H89: dihidrocloruro de N-[2-(p-Bromocinamilaminoetil)]-5-isoquinolinasulfonamida  
hCG: gonadotrofina coriónica humana  
HRP: del inglés, horseradish peroxidase  
IP3: inositol trifosfato  
IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza  
LH: hormona luteinizante  
LHrh: LH recombinante humana  
MEGA: del inglés, Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
MR: Receptor de Mineralocorticoides o tipo 1  
MUSCLE: MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation

MV: máxima verosimilitud

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NKA:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa

ORF Finder: del inglés, Open Reading Frame Finder

ORFs: marcos de lectura abiertos

PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato

PostR: período post reproductivo

PreR: período pre reproductivo

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RACE: del inglés, Rapid Amplification of cDNA Ends

RIA: radioinmunoanálisis

RT-PCT:

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SIAS (Sequence Identity And Similarity)

Src: del inglés, Stored Response Chain

StAR: del inglés Steroidogenic Acute Regulatory

STP: staurosporina

T<sub>m</sub>: temperatura de fusión

### Especies de anfibios y sinónimos.

Lo que se conoce acerca de la diversidad de los anfibios cambia permanentemente debido a que día a día se realizan nuevas descripciones y revisiones. Hay especies que desaparecen y otras nuevas que son descriptas. Además, el parentesco entre las especies está en revisión permanente y de allí surge que los nombres que se le otorgan a cada una de ellas sean variables. En esta tesis se utiliza la nomenclatura más actualizada, sugerida por Frost (2011, Amphibian Species of the World 5.5, an Online Reference, AMNH), por lo que a continuación se mencionan los sinónimos más conocidos de las especies incluidas en ella:

*Anaxyrus woodhousii* = *Bufo woodhousii*  
*Duttaphrynus melanostictus* = *Bufo melanostictus*  
*Glandirana rugosa* = *Rana rugosa*  
*Lithobates catesbeianus* = *Rana catesbeiana*  
*Lithobates pipiens* = *Rana pipiens*  
*Lithobates sylvaticus* = *Rana selvatica*  
*Pelophylax esculentus* = *Rana esculenta*  
*Pelophylax nigromaculata* = *Rana nigromaculata*  
*Pelophylax perezii* = *Rana perezii*  
*Pelophylax ridibundus* = *Rana ridibunda*  
*Rhinella arenarum* = *Bufo arenarum*  
*Rhinella marina* = *Bufo marinus*  
*Silurana tropicalis* = *Xenopus tropicalis*

### III Capítulo 1

## Capítulo 1. Regulación de la espermiación y de la síntesis de esteroides

En nuestro laboratorio se ha demostrado en *R. arenarum* el papel de las gonadotrofinas LH y FSH recombinantes humanas (FSHrh y LHRh) y de hCG en la inducción de la espermiación y la estimulación de la esteroidogénesis. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas gonadotrofinas inducen estos procesos son poco conocidos, aunque se sabe que el efecto de hCG sobre la espermiación es independiente de la síntesis de esteroides (Pozzi y Ceballos, 2000). Posteriormente, se propuso que en la activación de la espermiación están involucradas la NKA y la PKA (Volonteri y col., 2010), lo que no parece ocurrir con la esteroidogénesis estimulada en las mismas condiciones. Con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis de que hCG actúa a través de mecanismos de acción diferentes para la espermiación y la esteroidogénesis, se plantearon diversos diseños experimentales para estudiar la función no canónica de la NKA. Además, FSHrh tiene un efecto bifásico sobre la espermiación a diferencia de lo que ocurre con hCG cuya curva dosis respuesta es monofásica (Pozzi y col., 2006). Tomando como base la propuesta de que las distintas gonadotrofinas actúan sobre distintos tipos celulares, Leydig y Sertoli (Pozzi y col., 2001), se estudió la participación de la PKA en la espermiación y la síntesis de esteroides estimulados por dicha gonadotrofina.

### Materiales y Métodos

#### Animales

Para todos los experimentos se emplearon sapos machos adultos ( $170 \pm 15$  g) de la especie *R. arenarum*, recolectados a lo largo de todo el año en la provincia de Buenos Aires. La madurez sexual de los individuos se corroboró observando el tamaño y las características típicas de los machos adultos tales como el canto y la presencia del callo nupcial. Los animales se mantuvieron en el Bioterio de Animales No Tradicionales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, cuyo entorno tiene vegetación y libre acceso al agua, en condiciones naturales de luz y temperatura. Los animales podían alimentarse de los insectos presentes en el hábitat y se complementó la alimentación con grillos y zofobas (*Zophobas morio*) (Hadfield y col., 2006). El día previo a cada experimento los animales a utilizar se trasladaron al laboratorio, donde se los acondicionó en un cubil a temperatura ambiente y libre acceso al agua. La mayoría de los ensayos de esta tesis se realizó durante los períodos pre reproductivo (PreR, mayo a agosto), reproductivo

(R, septiembre a diciembre) y post reproductivo (PostR, enero a abril) (Denari y Ceballos, 2005).

### Obtención del material biológico

Los individuos fueron anestesiados por inmersión en 1% de solución acuosa de tricaina metano sulfonato (Sigma-Aldrich, EE.UU), neutralizada con bicarbonato de sodio de acuerdo con Gentz (2007) y su muerte fue consecuencia del procedimiento quirúrgico. Este protocolo está en concordancia con los principios establecidos en "Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals" promulgado por la "Society of the Study of Reproduction" y cuenta con la aprobación de la "Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (Protocolo N° 21), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Los experimentos se realizaron siempre entre las 10:00 am y las 12:00 am, con el objetivo de excluir la posible variabilidad en los resultados debido a los cambios circadianos en la producción de hormonas.

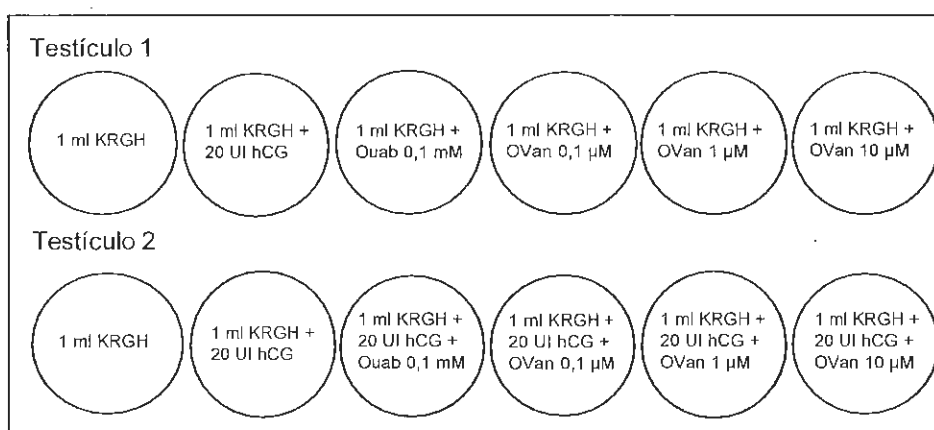
Los testículos se disecaron rápidamente en condiciones estériles, se colocaron en medio Krebs-Ringer-glucosa que contenía 10 mM de buffer Hepes (KRGH), pH 7,4 (ver Soluciones y Buffers) y se separaron de los cuerpos grasos, el mesorquio y los órganos de Bidder. Ambos testículos de cada animal utilizado pesaron entre 190 y 220 mg. El tejido se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 mm de grosor que pesaban  $20 \pm 3$  mg. Los extremos de los testículos no se incluyeron en los tratamientos. Previo a cada tratamiento, y con el fin de remover los espermatozoides liberados mecánicamente por la manipulación del tejido, los fragmentos de testículos se colocaron en una placa multipocillo y se incubaron en 1 ml de medio KRGH durante 1 hora a 28°C con agitación. Luego de esto, el medio fue descartado y sustituido por medio nuevo que contenía las diferentes drogas a utilizar en los tratamientos (Pozzi y Ceballos, 2000).

### Tratamiento *in vitro* de fragmentos testiculares

#### Papel de la bomba NKA

Con el objetivo de corroborar que la función de la bomba NKA que actúa durante la espermiación es la no canónica, se realizaron tratamientos con ortovanadato de sodio, el cual en el rango de las dosis utilizadas inhibe el transporte de iones por la NKA (Scanzano y col., 2007; Ochiai y col., 2009). Los fragmentos de cada testículo se transfirieron a una placa de cultivo multipocillo que contenía 1 ml de medio KRGH en cada pocillo, con o sin 20 UI/ml de hCG, ouabaína (Ouab) 0,1 mM, y ortovanadato

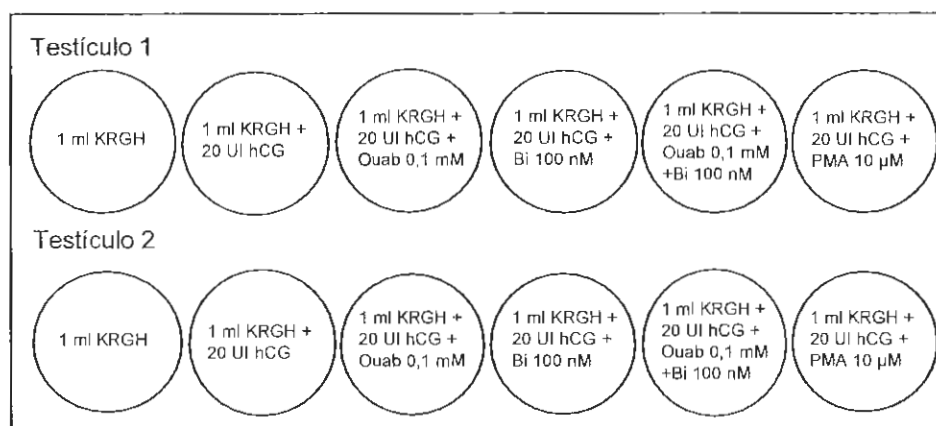
(Ovan) en distintas concentraciones (0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$ ). En el esquema experimental que se muestra a continuación se detallan los tratamientos por pocillo, donde en cada fila se distribuyen fragmentos elegidos al azar de uno de los testículos, lo que garantiza que cada testículo tenga sus propios controles de la espermiación. Éstos son, el control negativo representado por la espermiación sin estimular (KRGH) y el control positivo representado por la espermiación estimulada por gonadotrofina (KRGH + hCG 20 UI). Si los valores de los controles no difieren significativamente entre un testículo y otro, podemos suponer que los valores del resto de los tratamientos pueden ser comparables de la misma manera. Así, en uno de los testículos se observa el efecto de distintas concentraciones de ortovanadato sobre la espermiación sin estimular y en el otro testículo se observa dicho efecto pero sobre la espermiación estimulada.



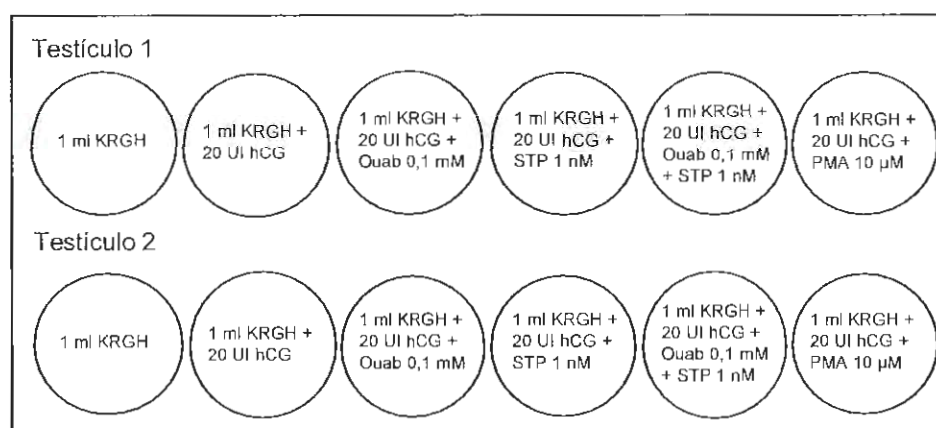
#### Rol de la PKC en la activación de la función no canónica de la NKA

Con el objetivo de analizar la participación de la PKC en la acción inhibitoria que ouabaína tiene sobre la espermiación, se realizaron tratamientos con hCG en dosis constante, con ouabaína, con y sin dos inhibidores de PKC, Bi (100nM) y STP (1 nM) y con un activador de PKC, PMA (10  $\mu\text{M}$ ). Nuevamente, en el esquema experimental que se muestra a continuación se detallan los tratamientos por pocillo, donde en cada fila se distribuyen fragmentos elegidos al azar de cada uno de los testículos. En este caso ambos testículos representan réplicas de cada tratamiento.

Esquema de los tratamientos con Bi y PMA:



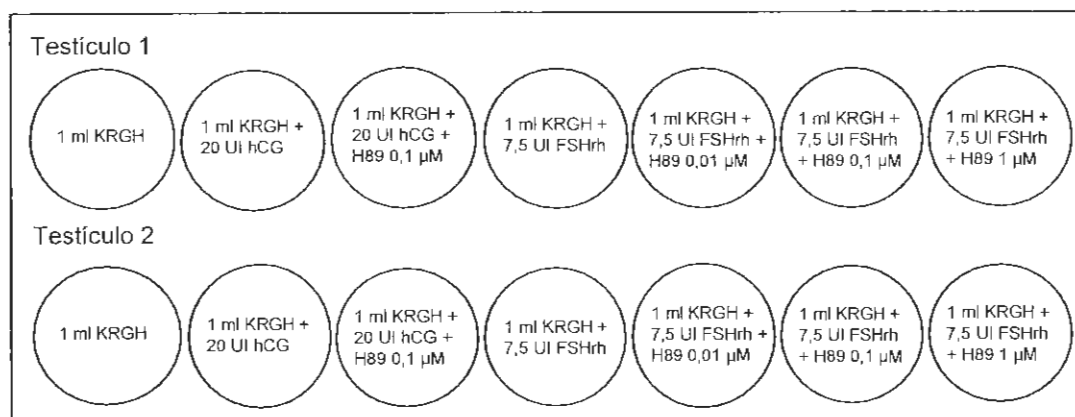
Esquema de los tratamientos con STP y PMA:



#### Rol de la PKA en la espermiación y la esteroidogénesis estimuladas por FSHrh

Con el objetivo de estudiar si la PKA está involucrada en la vía de señalización estimulada por FSHrh, tanto en la espermiación como en la esteroidogénesis, los fragmentos de testículo obtenidos como se detalló anteriormente fueron incubados en 1 ml de KRGH en presencia y ausencia de 7,5 UI de FSHrh (Pozzi y col., 2006), con distintas concentraciones de H89, inhibidor de la PKA (0,01; 0,10; 1  $\mu$ M). Para poder realizar comparaciones con el efecto provocado por hCG, dos fragmentos de cada testículo se incubaron con 20 UI de hCG uno de ellos y con 20 UI de hCG más 0,1  $\mu$ M de H89 el otro. El esquema que se muestra a continuación detalla los tratamientos realizados. En cada fila se distribuyen fragmentos elegidos al azar de cada uno de los testículos. Como en el esquema ya utilizado para los inhibidores de PKC, los testículos son réplicas de cada tratamiento.

## Esquema de los tratamientos con FSHrh y H89:



En todos los experimentos las placas se incubaron durante 2 horas a 28°C, en un baño con temperatura controlada y con agitación.

Cuantificación de la espermiación

Transcurrido el tiempo de tratamiento se retiraron cuidadosamente los fragmentos de tejido del medio de incubación. De cada medio se separó una alícuota de 100  $\mu$ l para realizar la cuantificación de espermatozoides y el resto se guardó a -20°C para la posterior medición de andrógenos.

El recuento de los espermatozoides liberados al medio de incubación se realizó utilizando una cámara de Neubauer que consiste en un portaobjetos con una cuadrícula de dimensiones conocidas, en donde se puede contar el número de células por unidad de área. Antes de la cuantificación, y con el fin de inmovilizar los espermatozoides, a los 100  $\mu$ l de medio se les adicionaron 5  $\mu$ l de etanol. El conteo de los espermatozoides se realizó con un microscopio de campo claro utilizando el objetivo de 40X. En caso que fuera necesario se realizaron distintas diluciones del medio con el fin de facilitar el conteo de espermatozoides. El número de espermatozoides por mililitro se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$N = n \times \text{inversa del factor de dilución} \times (1/\text{factor volumen})$$

Siendo:

N = número de espermatozoides por ml

n = número de espermatozoides contados

Factor volumen =  $1 \times 10^{-4}$  ml x número de cuadrantes contados.

### Cuantificación de andrógenos mediante radioinmunoanálisis

La producción de andrógenos en los medios de cultivo obtenidos en los distintos experimentos fue analizada por RIA. Para ello, se utilizó el marcador radioactivo [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]testosterona (70 Ci/mmol; Perkin-Elmer, EE.UU) y un anticuerpo policlonal anti-testosterona preparado en oveja (Universidad de Colorado, Colorado, EE. UU.). Este último se empleó en una dilución final de 1:125.000 y posee una reacción cruzada de 35% con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona. Los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron, respectivamente, 7,6% y 9,4%. La curva de calibración abarcó un rango de concentraciones entre 31,25 y 4000 pg/ml y se obtuvo incubando en buffer RIA (ver Soluciones y Buffers) una cantidad constante de testosterona-<sup>3</sup>H y de anticuerpo, y concentraciones crecientes de testosterona radioinerte. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0,5 ml durante 20-22 hs a 4°C. Para separar la hormona unida de la libre se utilizó el método de carbon:dextrano (0,5:0,05 % p/v). La radioactividad total se determinó incubando testosterona-<sup>3</sup>H en ausencia de anticuerpo y sin separar la hormona libre de la unida. La unión inespecífica se determinó en ausencia del anticuerpo. El unido máximo se calculó con testosterona-<sup>3</sup>H y anticuerpo, en ausencia de hormona radioinerte. Estos parámetros y todos los puntos de la curva se realizaron por triplicado. Las mediciones de las muestras se realizaron por duplicado. Luego de la separación de la hormona unida y la libre, la radioactividad de cada muestra se determinó utilizando 1,5 ml de líquido de centelleo OptiPhase-Hi safe 3 (Wallac Co., Finlandia) y el equipo Wallac 1409 DSA (Wallac Co., Finlandia.). Dado que el anticuerpo tiene una reacción cruzada del 35% con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, los resultados se expresaron como la concentración de andrógenos (pg/ml de medio).

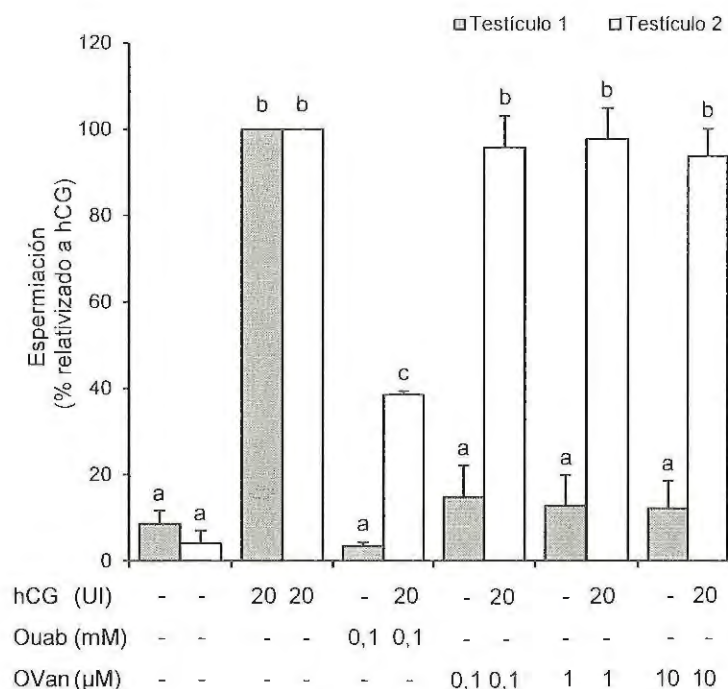
### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  el error estándar (EE), y se analizaron y compararon mediante ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos (Steel y Torrie, 1980). Tanto para la cantidad de espermatozoides como para la producción de andrógenos los datos se analizaron utilizando un diseño de ANOVA generalizado de bloques al azar. Para los tratamientos con ortovanadato, con una única observación por bloque, para los tratamientos con inhibidores de PKC, con más de una observación por tratamiento dentro de cada bloque. En todos los casos, cada sapo fue considerado como un bloque. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., OK, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0.05$ . Antes del análisis estadístico, los datos fueron probados

para normalidad y homocedasticidad por medio de Lilliefors y la prueba de Bartlett, respectivamente. Los valores de la cantidad de espermatozoides fueron transformados aplicando el  $\log_{10}(x)$  para corregir la normalidad. Los datos de la producción de andrógenos no se transformaron ya que satisfacían los supuestos del ANOVA.

## Resultados y Discusión

Los resultados presentados en la figura 5 muestran que con ninguna de las dosis de ortovanadato de sodio utilizadas, la inhibición del transporte de iones modificó la espermiación con respecto al control sin tratar con el inhibidor, tanto para la respuesta basal como para la estimulada. Estos resultados son similares a los obtenidos por Volonteri y col. (2010), quienes bloquearon el transporte de iones utilizando un inhibidor de canales de  $\text{Na}^+$ . En dicho trabajo, se mostró que la activación de la bomba NKA se encontraba involucrada en el proceso de espermiación estimulado por hCG. En primer lugar, se utilizó ouabaína como inhibidor de la NKA y los resultados mostraron que la espermiación estimulada por hCG disminuía, a diferencia de lo propuesto originalmente por Russo y Burgos (1969), quienes habían sugerido que el efecto de hCG sobre la espermiación involucraba la inhibición de la bomba celular. En cambio, los resultados obtenidos por Volonteri y col. (2010) parecían indicar que la inhibición del transporte de iones era lo que disminuía la espermiación. Para verificar si ese era el caso, se bloquearon los transportadores de  $\text{Na}^+$  sensibles a amilorida, lo que tampoco modificó ni la espermiación basal ni la estimulada por hCG. Esos resultados hicieron pensar que quizás no era el transporte de iones lo que se encontraba involucrado en dicho proceso. Los resultados obtenidos con ortovanadato de sodio contribuyen a sostener esta última idea y a reenfocar la función de la NKA involucrada en la espermiación.

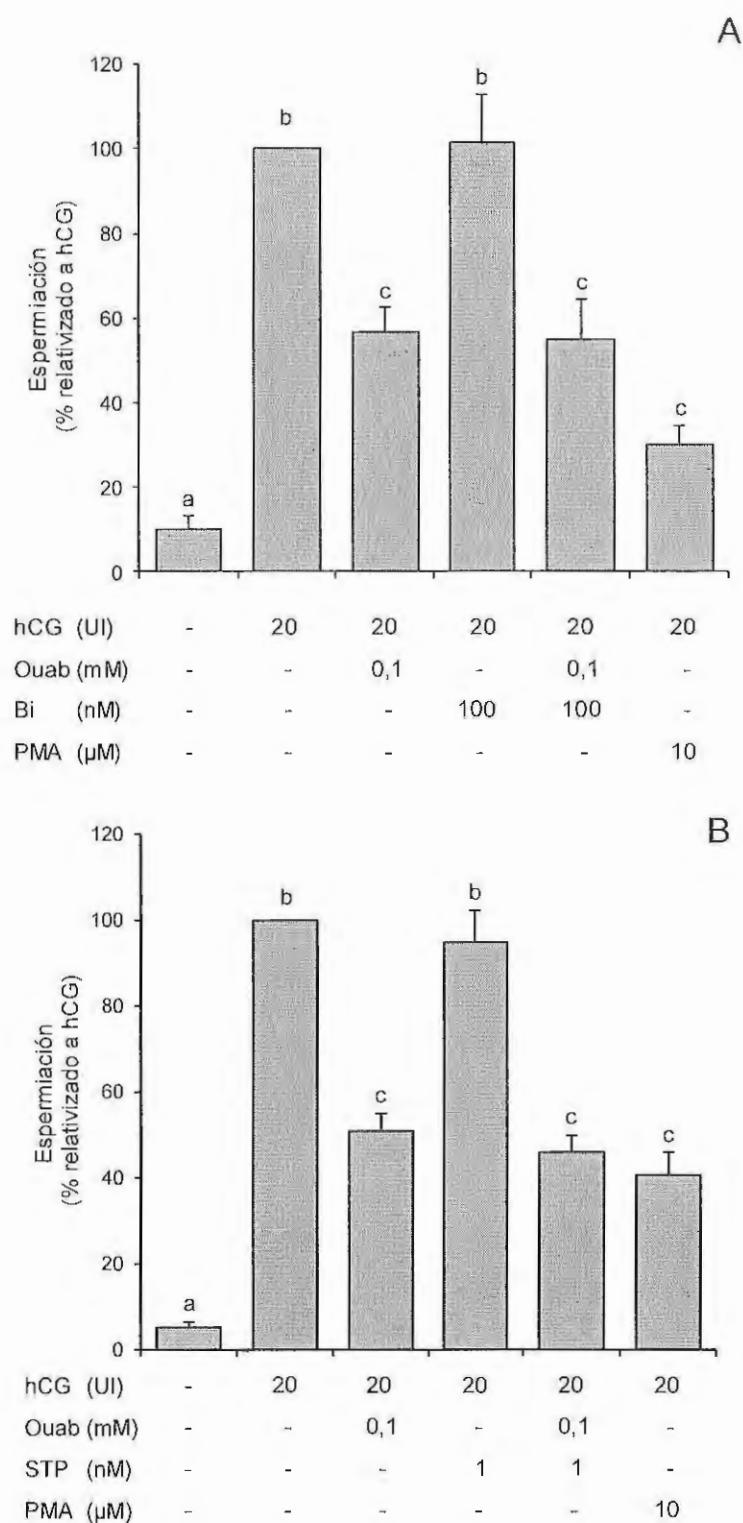


**Figura 5:** Efecto de distintas dosis de ortovanadato de sodio sobre la espermiación basal y estimulada con 20 UI de hCG. La espermiación está expresada como porcentaje respecto al valor del control positivo, que representa el 100%. Los resultados están expresados como la media de  $n = 8 \pm \text{EE}$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos con  $p < 0,05$ . Cada testículo tiene su control negativo (sin tratamiento) y su control positivo (tratado con hCG). Ouabaína = Ouab. Ortovanadato de sodio = OVan.

Hace ya algunos años se describió otra función para la NKA conocida como función no canónica. Como tal, su rol es el de un transductor de señales (Pierre y Xie, 2006), lo que representa una función separada de su actividad como transportador de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática con gasto de energía. Por otra parte, se describió que Src, proteína no receptora con actividad de tirosina quinasa, interactúa con un conjunto de NKAs que se localiza en caveolas de la membrana plasmática. Si bien el mecanismo de activación de Src es aún hoy controversial (Gable y col., 2014), se sugiere que cuando ouabaína se une a las bombas de ese conjunto en particular provoca la activación de la quinasa, iniciando así una cascada de eventos de señalización y la subsiguiente transactivación de EGFR (Xie y Askari, 2002). Una de las vías que puede activar la transactivación de EGFR involucra a la PKC (Haas y col. 2002; Liu y col., 2003; Yuan y col. 2005). Con estos antecedentes, se planteó la idea de que quizás el efecto inhibitorio de ouabaína en el sapo se podría dar por activación de la PKC, dado que resultados previos mostraron que PMA inhibe la espermiación estimulada por hCG. Para probar esto, se hizo un diseño experimental en el que se

utilizó hCG y ouabaína más inhibidores de PKC (Bi ó STP) con el objeto de determinar si estos últimos revertían el efecto de ouabaína sobre la espermiación inducida.

Los resultados obtenidos utilizando ambos inhibidores son coincidentes y muestran que la inhibición de la PKC no revierte el efecto inhibitorio de ouabaína sobre la espermiación estimulada por hCG (Figura 6 A y B). Si ouabaína actuara estimulando la vía de la PKC para bloquear la espermiación, entonces su efecto se vería inhibido ante la presencia de Bi o STP, lo que no ocurre en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 6:** Efecto del tratamiento con Bi (A) y STP (B) sobre la espermiación inducida por hCG e inhibida por ouabaína. La espermiación está expresada como porcentaje respecto al valor del control positivo, que representa el 100%. Los resultados están expresados como la media de  $n=7 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos con  $p < 0,05$ . Control negativo=sin tratamiento. Control positivo=tratado con hCG. Ouab = Ouabaína. Bi = Bisindolmaleimida. STP = Staurosporina. PMA = Forbol-12-miristato-13-acetato.

Hasta acá se puede plantear que la espermiación inducida por hCG en *R. arenarum* no involucraría el transporte de iones por la NKA y que el proceso estaría regulado de alguna manera por la función no canónica de la enzima dado que la acción de ouabaína disminuye la espermiación inducida por hCG. El tratamiento con ortovanadato, un inhibidor la actividad ATPásica, no tiene efecto sobre dicho proceso y se sabe que el uso del mismo no afecta la actividad de Src (Tian y col., 2006). Como se mencionara en la Introducción, el sitio de unión de ouabaína a la NKA está muy conservado entre las distintas especies, lo cual sugiere que juega un papel significativo en el mecanismo de acción (Lingrel, 2010). Es decir, este sitio podría tener un ligando endógeno que cumpla importantes funciones fisiológicas.

Por otro lado, se describió que muchos miembros de la familia Bufonidae secretan por las glándulas parotoidas compuestos esteroideos, de tipo glucósido cardíaco, que se denominan bufadienólidos. En un trabajo de Perera Córdova y col. (2016) se muestra cómo esta sustancia, y otras similares, inhiben la actividad de la bomba en una preparación de riñón de origen humano. Laursen y col. (2015) analizaron, por cristalografía de rayos X, la estructura del complejo constituido por NKA de riñón de porcino y bufalina, y su apariencia es estructuralmente similar a la de los complejos formados por NKA y ouabaína. Estos hallazgos sugirieron un mecanismo similar para la inhibición de NKA por bufadienólidos, lo que permitiría sostener la hipótesis de la existencia de un ligando endógeno semejante a ouabaína en anfibios. Por otra parte, varios trabajos focalizados en el estudio de la función de señalización de NKA mostraron que dosis bajas de ouabaína, que no llegaban a afectar el transporte de iones a través de la bomba, lograban activar una vía de señalización (Aizman y col., 2001; Dmitrieva y Doris, 2003; Contreras y col., 2004; Saunders y Scheiner-Bobis, 2004).

Es importante recordar lo que se mencionara en la Introducción, esto es que en los meses de enero y febrero se reinicia la espermatogénesis y que es posible encontrar la estructura de "matas de espermatozoides" que no se liberan de las células de Sertoli. Por otra parte, también es importante considerar que la espermiación de esos espermatozoides puede inducirse *in vitro* por hCG a lo largo de todo el año (Pozzi y col., 2000). ¿Puede la NKA tener algún rol en la inhibición de la espermiación a lo largo del año, antes que se produzca el amplexo?

Los resultados mostrados en distintos trabajos, sumados a los presentados en esta tesis, permiten proponer que un putativo ligando endógeno para la NKA del testículo de *R. arenarum* podría estar evitando, mediante la activación de vías de señalización

asociadas a la función no canónica de la bomba, el desprendimiento de los espermatozoides ya maduros de las células de Sertoli sin alterar la relación de iones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la célula. Además, que durante el amplexo el aumento de las gonadotrofinas podría bloquear la mencionada inhibición.

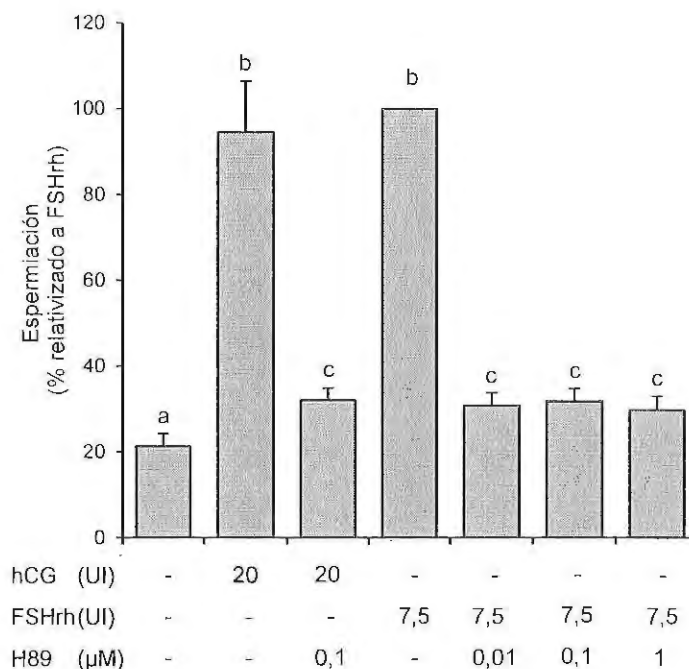
En esta tesis, no se pudo demostrar que la PKC estuviese involucrada en la vía de señalización activada por ouabaína (Figura 6 A y B), por lo que se podrían pensar por lo menos en dos alternativas. Obviamente, una de ellas es que ouabaína esté activando una vía de señalización que no incluya a PKC. Por otro lado, que la isoforma de PKC que expresa el testículo del sapo no sea inhibida ni por Bi ni por STP, a pesar de ser inhibidores de amplio espectro. Esto último permitiría explicar los resultados obtenidos con PMA, activador de PKC, que muestran inhibición de la espermiación estimulada por hCG.

Algunos trabajos, enfocados a estudiar la regulación de la actividad de la NKA plantean que la bomba puede ser regulada por AMPc, vía la activación de PKA y la subsecuente fosforilación de la subunidad  $\alpha$ , lo que resulta en la endocitosis de las bombas localizadas en las caveolas (Meister y col., 1989; Bertorello y col., 1991; Cui y Xie, 2017). Por otra parte, Volonteri y col. (2010) propusieron que la acción de hCG sobre la espermiación está mediada por la activación de PKA, que actuaría sobre la actividad de la bomba. Esto podría sugerir que la acción de hCG genera una disminución de la NKA de las caveolas, anulando la inhibición de la espermiación.

#### Rol de FSHrh en la regulación de la espermiación.

Pozzi y col. (2001) informaron que el tratamiento con FSHrh de células de Sertoli induce un aumento de AMPc. Por otra parte, dicha gonadotrofina puede estimular tanto la espermiación como la esteroidogénesis (Pozzi y col., 2006), aunque la curva dosis respuesta indica que FSHrh tiene un efecto bifásico sobre la espermiación a diferencia de lo que ocurre con hCG, cuya curva dosis respuesta es monofásica. Estos antecedentes sugirieron que es probable que ambas gonadotrofinas usen distintos mecanismos. Para analizar esto, se estudió el efecto de la inhibición de la PKA sobre la espermiación y la esteroidogénesis estimulada por FSHrh.

Los resultados obtenidos cuando se analiza la espermiación inducida por FSHrh, en presencia o ausencia de un inhibidor de la PKA, muestran que la espermiación puede estimularse con FSHrh y su efecto no difiere significativamente del de hCG. Además, todas las concentraciones utilizadas de H89 generan una disminución de la espermiación estimulada por FSHrh tal como ocurre con hCG (Figura 7).

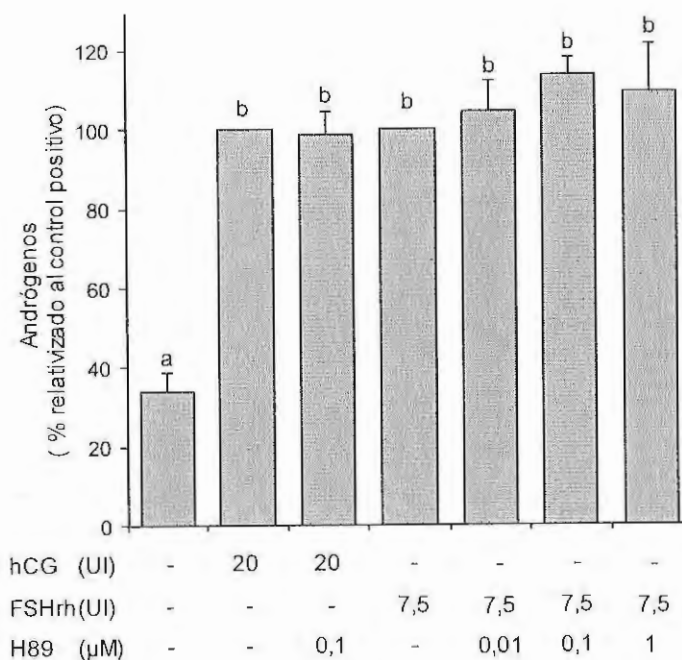


**Figura 7:** Efecto de distintas dosis de H89, inhibidor de PKA, sobre la espermiación basal y estimulada por hCG y FSHrh. La espermiación está expresada como porcentaje respecto al valor de correspondiente al control positivo (FSHrh). Los resultados están expresados como la media de  $n = 5 \pm EE$ . Letras diferentes indican valores estadísticamente significativos con  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos con hCG coinciden con lo informado por Volonteri y col. (2010) y permiten sugerir que ambas gonadotrofinas actúan en la célula de Sertoli a través de mecanismos similares, activando PKA, aunque no son suficientes para determinar si las gonadotrofinas actúan a través de un único o distintos receptores.

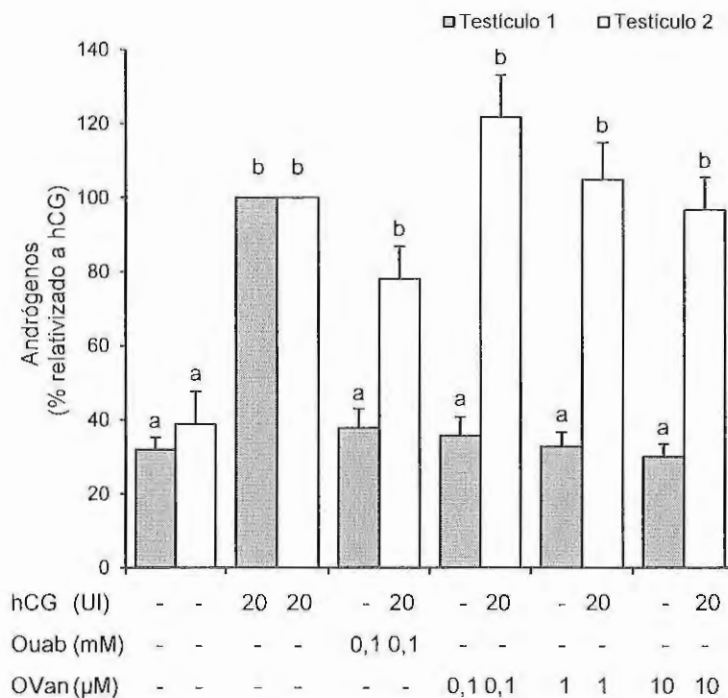
Ahora bien, ¿qué ocurre con la síntesis de esteroides?

En todos los experimentos mostrados hasta aquí se midió también la producción de andrógenos, con el objetivo de determinar si la regulación de la síntesis de esteroides se llevaba a cabo utilizando los mismos mecanismos que para la espermiación. La inhibición de la PKA con H89 no parece tener efecto ni sobre la síntesis de andrógenos estimulada por hCG ni por FSHrh (Figura 8).

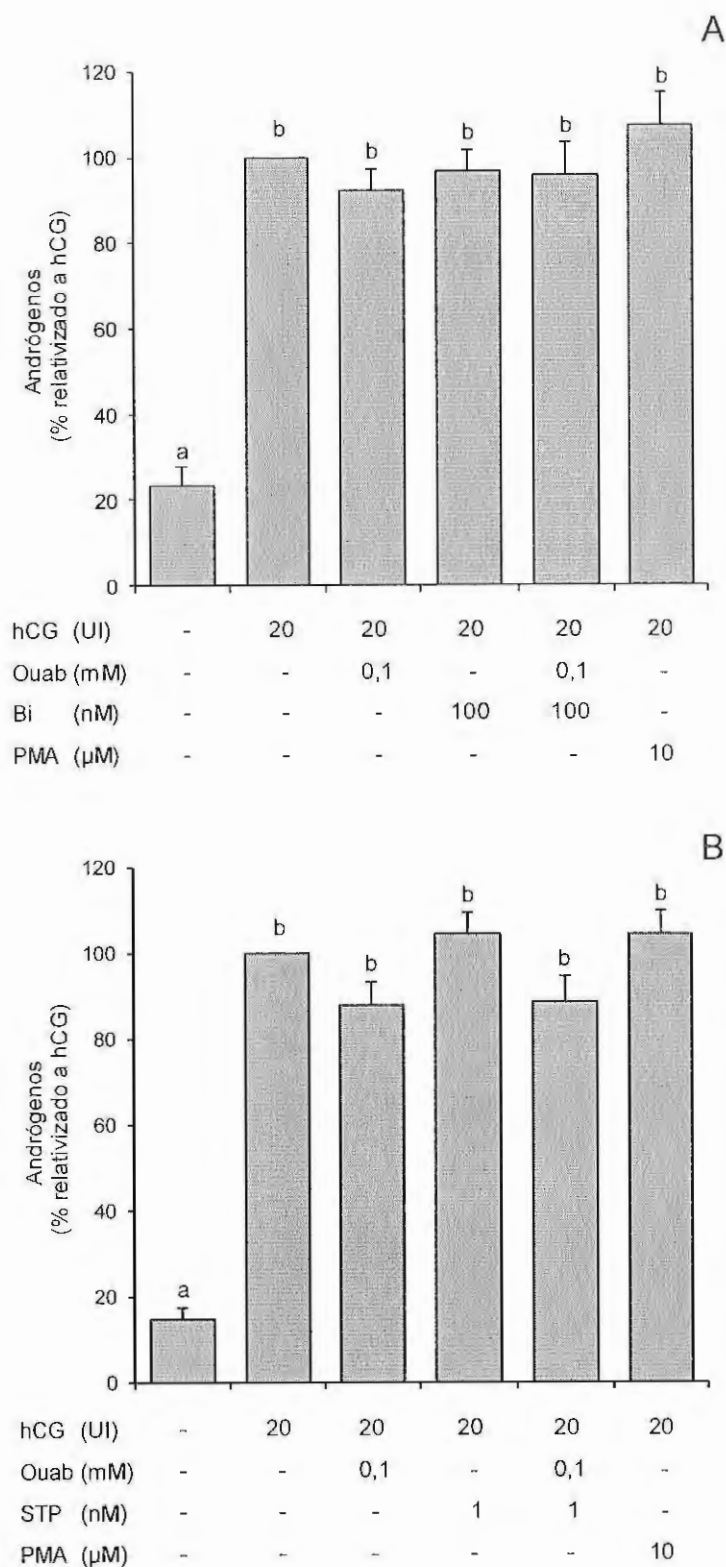


**Figura 8:** Efecto de distintas dosis de H89 sobre la esteroidogénesis estimulada por hCG y FSHrh. La síntesis de andrógenos está expresada como porcentaje respecto al valor del control positivo (FSHrh). Los resultados están expresados como la media de  $n = 5 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ .

Además, ni el ortovanadato de sodio (Figura 9) ni ambos inhibidores de PKC en presencia de ouabaína afectan la producción de andrógenos (Figura 10 A y B).



**Figura 9:** Efecto de distintas dosis de ortovanadato de sodio sobre la síntesis de andrógenos basal y estimulada con 20 UI de hCG. La síntesis de andrógenos está expresada como porcentaje respecto al valor del control positivo, que representa el 100%. Los resultados están expresados como la media de  $n = 8 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos con  $p < 0,05$ . Cada testículo tiene su control negativo (sin tratamiento) y su control positivo (tratado con hCG). Ouabaína = Ouab. Ortovanadato de sodio = OVan.



**Figura 10:** Efecto del tratamiento con Bi (A) y STP (B) sobre la síntesis de andrógenos estimulada por hCG. La producción de andrógenos está expresada como porcentaje respecto al valor del estimulado. Los resultados están expresados como la media de  $n = 7 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos con  $p < 0,05$ .

Estos resultados ratifican que en *R. arenarum* ambos procesos, esteroidogénesis y espermiación, son regulados de manera independiente.

En conclusión, se confirma que NKA está implicada en el proceso de espermiación estimulado por hCG, aunque en su función no canónica. En cambio, ninguna de sus dos funciones, la de transporte de iones o la de receptor para la activación de vías de señalización, está involucrada en la síntesis de andrógenos estimulada por hCG. Además, en la espermiación estimulada por ambas gonadotrofinas, hCG y FSHrh, se activa la vía de la PKA. En cambio, H89 no afecta la síntesis de andrógenos aunque, paradójicamente, trabajos anteriores del laboratorio describieron que la esteroidogénesis puede ser estimulada por tratamientos con 8-Br-AMPc (Volonteri MC, Tesis de Licenciatura 2009).

Varios trabajos que estudiaron la regulación de la esteroidogénesis mostraron que existen diferentes vías por las que se puede activar la síntesis de esteroides (para revisiones ver Stocco y col., 2005; Socco y col., 2017), por lo que una posibilidad a tener en cuenta es que la activación de la PKA con 8-Br-AMPc podría corresponder a algún paso de una vía distinta a la estimulada por las gonadotrofinas utilizadas. No hay demasiados estudios en la literatura con respecto a anfibios. Por ejemplo, Di Fiore y col. (2016) proponen que el d-aspartato es un regulador importante de la síntesis de esteroides testiculares en *P. esculentus* y que podría actuar utilizando diversos mecanismos, entre ellos la activación de adenilato ciclasa (Di Fiore y col., 2014).

En *R. arenarum*, GnRH también posee receptores en el testículo y regula la esteroidogénesis pero su efecto a corto y largo plazo es inhibitorio (Canosa y col., 2002).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos permiten proponer que hCG tiene dos mecanismos de acción diferentes, uno involucrando a la NKA, responsable de la espermiación y otro, independiente de la bomba, responsable de la esteroidogénesis.

## IV Capítulo 2

## Capítulo 2. Regulación de la esteroidogénesis testicular

En el capítulo 1 de esta tesis se determinó que distintos tratamientos que tienen efecto en la espermiación no modifican la síntesis de andrógenos, por lo que se decidió profundizar los estudios en la regulación de la esteroidogénesis testicular. Para esto, se plantearon experimentos para analizar el efecto de los GC sobre la síntesis de andrógenos y sobre la expresión de la proteína StAR.

### Materiales y Métodos

#### Animales

Se utilizaron sapos machos adultos de la especie *R. arenarum*. Los animales fueron recolectados, mantenidos y alimentados como se describió en el Capítulo 1.

#### Obtención de material biológico

Para la obtención de los testículos, los animales se anestesiaron y procesaron como se describió en el Capítulo 1.

En todos los experimentos los testículos se disecaron rápidamente, se colocaron en medio de cultivo L-15 estéril (Canosa y Ceballos, 2002) (ver Soluciones y Buffers) y se separaron de los cuerpos grasos, el mesorquio y los órganos de Bidder. Ambos testículos de cada animal utilizado pesaron entre 190 y 220 mg. Desde este paso en adelante se trabajó en condiciones de esterilidad. El tejido se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 mm de grosor que pesaban  $20 \pm 3$  mg. Los extremos de los testículos no se incluyeron en los tratamientos. Además, se extrajeron ambos riñones con sus respectivas glándulas interrenales. Ambos órganos se separaron rápidamente bajo lupa en una placa de Petri con medio KRGH. Se realizó un lavado exhaustivo de las interrenales con el mismo medio con el objeto de eliminar los restos de sangre.

### Papel de los glucocorticoides en la regulación de la síntesis de andrógenos

#### Efecto de corticosterona sobre la secreción basal y estimulada de andrógenos

Los fragmentos de cada testículo se transfirieron al azar a placas de cultivo multipocillo que contenían el medio de cultivo L-15 con y sin distintas concentraciones de corticosterona, el glucocorticoide natural de la especie en estudio (Ceballos y col., 1983). Las concentraciones de corticosterona utilizadas estuvieron en el orden de los valores fisiológicos determinados en el plasma de *R. arenarum*, 15 nM y 150 nM, que corresponden a los valores plasmáticos de corticosterona de los períodos no reproductivo (PreR + PostR) y reproductivo, respectivamente (Denari y Ceballos,

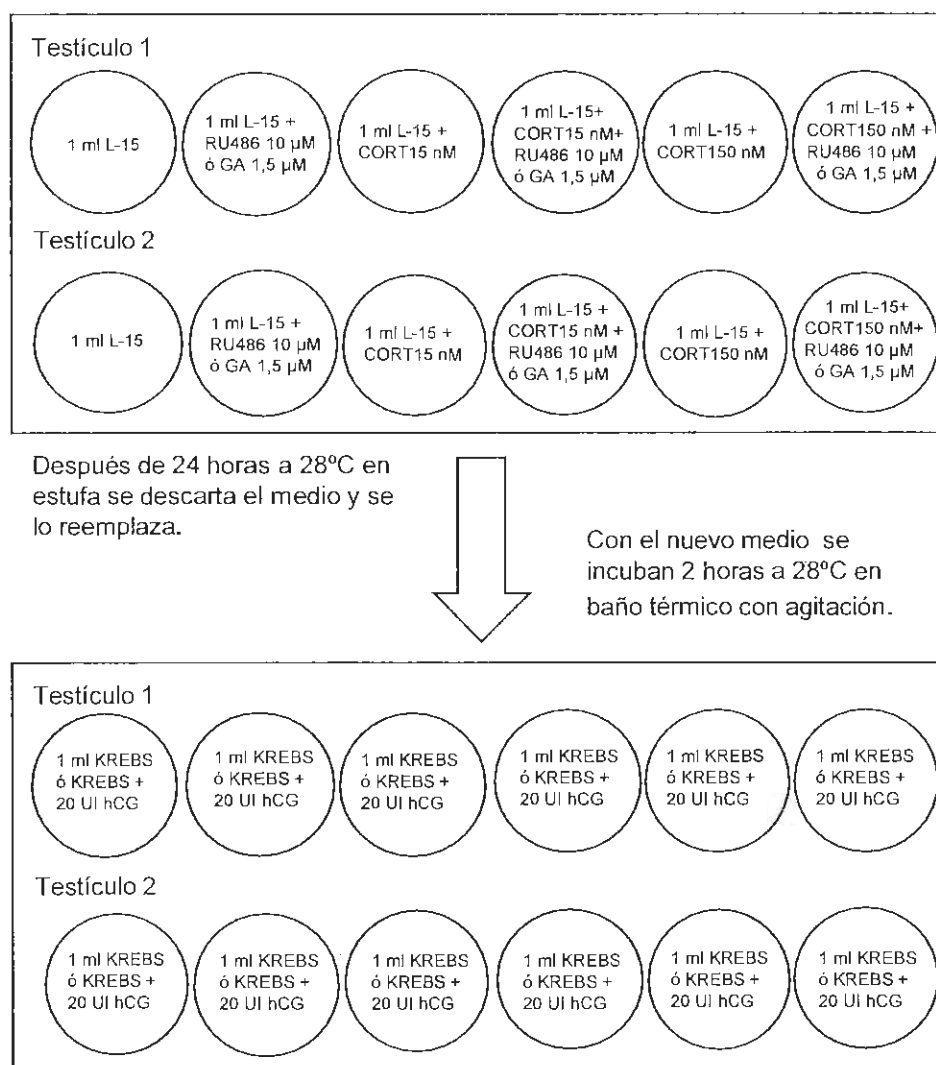
2005). Las placas se colocaron en estufa a 28°C durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se descartaron los medios de cultivo y se reemplazaron por 1 ml de una solución de KRGH, pH 7,4 (ver Soluciones y Buffers). Luego de una pre-incubación de media hora en un baño con agitación a 28°C para eliminar los restos de medio de cultivo, los medios fueron descartados y los fragmentos se incubaron durante dos horas a 28°C con agitación en 1 ml de KRGH solo o con 20 UI de hCG, para determinar la producción basal y estimulada de andrógenos.

Rol del receptor de glucocorticoides (GR) y de la enzima 11 $\beta$ -HSD en el efecto de corticosterona sobre la síntesis basal y estimulada de andrógenos

Con el objetivo de determinar si los efectos obtenidos con corticosterona estaban mediados por el GR o por el receptor de mineralocorticoides (MR), se utilizó RU486, antagonista del GR (Bygdeman y col., 1993), en una concentración de 10  $\mu$ M. El efecto antagonista de dicha sustancia en *R. arenarum* fue probado previamente por nuestro grupo de investigación (Denari y Ceballos, 2006). Por otra parte, en otra serie de experimentos, y con el objetivo de establecer el papel que cumple la enzima 11 $\beta$ -HSD, se utilizó ácido glicirretínico (GA), un inhibidor de la mencionada enzima, en una concentración de 1,5  $\mu$ M (Brem y col., 1989). La concentración utilizada se seleccionó teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio en la misma especie (Denari y Ceballos, 2005). Las placas se colocaron en estufa a 28°C durante 24 horas. Pasado dicho tiempo se procedió como se detalló para el efecto de corticosterona sobre la síntesis basal y estimulada de andrógenos.

El esquema general del protocolo utilizado se detalla a continuación:



## Rol de la proteína StAR en la regulación de la síntesis de andrógenos

### Experimentos preliminares

Con el objetivo de fijar las condiciones experimentales adecuadas se llevaron a cabo experimentos preliminares modificando el tiempo de tratamiento. Para ello, 6 fragmentos de testículo, obtenidos como ya se mencionara, se distribuyeron al azar en una placa multipocillo que contenía 1 ml de medio de cultivo L-15 por pocillo. Estos fragmentos conformaron el grupo control. Con el otro testículo se procedió de la misma manera solo que cada pocillo contenía 1 ml de medio L-15 más 40 UI de hCG. Estos fragmentos conformaron el grupo tratado. Todos los fragmentos se incubaron a 28°C por distintos tiempos, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos. En cada uno de estos tiempos se detuvo el tratamiento y cada medio de cultivo se guardó a -20°C para la

determinación de andrógenos. Los fragmentos de tejido se homogeneizaron en buffer de homogeneización (ver Soluciones y Buffers) para ser analizados por Western blot.

#### Efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre la proteína StAR

Para analizar el efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre la expresión de StAR y la síntesis de andrógenos, se diseñó un protocolo experimental utilizando hCG. Para evitar que la cantidad de proteínas fuera un factor limitante en las determinaciones, cada uno de los tratamientos se realizó sobre 2 fragmentos de testículo elegidos al azar, uno de cada testículo, de manera que ambos órganos estuvieran representados en cada uno de ellos. Los fragmentos testiculares se cultivaron en medio L-15 durante 4 horas a 28°C, sin hCG o con distintas concentraciones de la gonadotrofina, 5, 20 y 40 UI/ml.

De la misma manera se procedió cuando se analizó el efecto de 8-Br-AMPC, conocido activador de PKA. Los tratamientos fueron sin 8-Br-AMPC o con 0,1, 0,5 o 1 mM del análogo de AMPC.

Tanto en los tratamientos realizados con hCG como en aquellos con 8-Br-AMPC, al finalizar la incubación se guardaron los medios a -20°C para la posterior cuantificación de andrógenos. Los fragmentos testiculares se trataron como se detalla en la sección "Procesamiento de los fragmentos testiculares tratados *in vitro*".

#### Rol de los glucocorticoides en la regulación de la proteína StAR

Para analizar el efecto de corticosterona en la regulación de StAR, cada testículo se cortó en seis fragmentos descartando los extremos. Dos fragmentos de cada testículo se distribuyeron al azar en pocillos de placas multipocillo que contenían 2 ml de medio de cultivo L-15 sin (control) y con distintas concentraciones de corticosterona (15 y 150 nM). Cada tratamiento se realizó por duplicado.

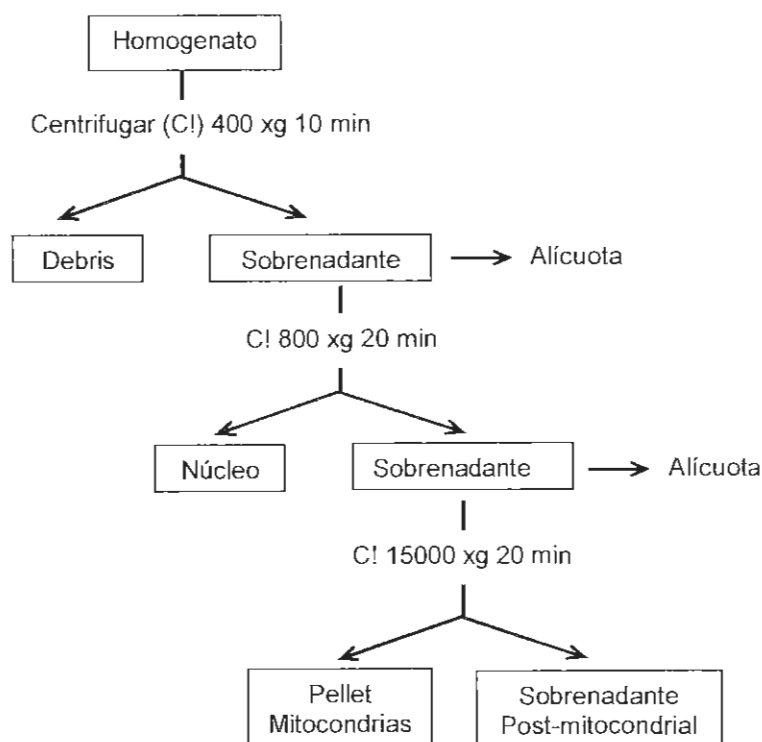
Las placas se incubaron durante 24 horas a 28°C. Pasado este tiempo, se retiró el medio y, para cada tratamiento, a uno de los duplicados se lo reemplazó con 2 ml de KRGH mientras que al otro duplicado por 2 ml de KRGH más 20 UI de hCG. Luego, la placa se incubó a 28°C con agitación durante 2 horas. Terminada la incubación, se guardaron los medios a -20°C para la posterior cuantificación de la producción de andrógenos. Los fragmentos testiculares se trataron como se detalla en la sección "Procesamiento de los fragmentos testiculares incubados *in vitro*".

#### Obtención de fracciones subcelulares

Dado que StAR es una proteína que se sintetiza como un precursor de 37 kDa en el citosol, se importa a las mitocondrias y se procesa a su forma madura de 30 kDa (King

y col, 1995), se realizaron distintas pruebas para determinar qué fracción subcelular estudiar en respuesta a la estimulación. Para ello, testículos y glándulas interrenales de *R. arenarum* se homogeneizaron en frío utilizando buffer de homogeneización en una proporción de 1 ml del mismo cada 250 mg de tejido (Pozzi y col., 1997). Para esto, se utilizó un homogeneizador Potter-Elvehjem vidrio-teflón. Como control positivo del anticuerpo a utilizar, anti StAR de *Homo sapiens*, se utilizaron glándulas adrenales de ratón. Se utiliza este control dado que la secuencia aminoacídica de StAR de ratón comparte un alto porcentaje de identidad con la secuencia de StAR de humanos. Esto podrá corroborarse en la sección "Validación del anticuerpo". Cada homogenato se centrifugó a 400 xg durante 10 minutos para sedimentar células intactas (debris) que fueron descartadas. Una fracción del sobrenadante se separó y guardó a -20°C, denominándola fracción total. Al resto del sobrenadante se le realizó una segunda centrifugación a 800 xg durante diez minutos para precipitar los núcleos que también se descartaron. El sobrenadante constituye la fracción post-nuclear. Nuevamente se separó y guardó una alícuota de esta fracción a -20°C. El resto de la fracción post-nuclear se centrifugó a 15000 xg durante 20 minutos. Como resultado se obtuvo un precipitado enriquecido en mitocondrias. El sobrenadante se guardó como fracción post mitocondrial y el precipitado se resuspendió en 70 µl de buffer homogenato constituyendo la fracción mitocondrial. Para cuantificar las proteínas totales de cada fracción se utilizó un fluorómetro Qubit (Invitrogen, EE.UU).

Se decidió incluir en el estudio a la glándula interrenal debido a que en su estructura hay una gran proporción de células esteroideogénicas (Regueira y col., 2013a), a diferencia de lo que ocurre en el testículo, en el cual las células de Leydig constituyen una pequeña proporción.

Esquema del fraccionamiento subcelular llevado a cabo.Validación del anticuerpo anti StAR

Para cuantificar la proteína StAR de *R. arenarum* mediante la técnica de Western blot fue necesario realizar varios ensayos de validación del anticuerpo a utilizar, dado que en el laboratorio no hay trabajos previos sobre la proteína mencionada y no se encuentran disponibles anticuerpos comerciales anti-StAR de anfibios. El anticuerpo seleccionado, en base al trabajo de Burrone y col. (2012), es el anticuerpo policlonal anti StAR de *H. sapiens* hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU). En dicho trabajo se utilizó el mencionado anticuerpo para realizar inmunohistoquímica en testículos del anuro *P. esculentus*. El antígeno contra el que se generó el anticuerpo es la secuencia completa de la proteína de origen humano que posee 285 aminoácidos (30 kDa). El alineamiento de esta secuencia con la secuencia de la proteína StAR de ratón (control positivo) mostró una identidad aproximada del 87% y con las secuencias de la proteína StAR de distintos anfibios mostró, aproximadamente, un 60% de identidad aminoacídica (Figura 11). En dicha figura se puede apreciar claramente que la secuencia de ratón es mucho más parecida que la de los anfibios a la secuencia de *H. sapiens*. Sin embargo, el porcentaje de identidad que se obtuvo en la alineación de

las secuencias, que incluyen a los anfibios, permitió suponer que entre los múltiples epítopes que reconoce el anticuerpo algunos de ellos se encuentre presente en la proteína StAR de *R. arenarum*.

|                        |                                                                                                                 |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>H. sapiens</i>      | MLLATFKLCAGSSYRHM RNMKGLRQQ AVMAI SQEL NR RAL GGTPSTWI NQVRRRS                                                  |
| <i>M. musculus</i>     | . F . . . . . H . . . L . . G . . . W . . . DSS . - G . MG . . . . .                                            |
| <i>X. laevis</i>       | . . P . . . . . I . . . . . L . . . . . T . . . . . RT . AV . LTH . . EK L . . V . . G . GK . . . . . I . . K . |
| <i>L. catesbeianus</i> | . . P . . . . . I . . . . . L . . . . . T . . . . . RT . AV . L . H . . EK L . . V . . G . . Q . . . . .        |
| <i>G. rugosa</i>       | . . P . . . . . I . . . . . L . . . . . T . . . . . RT . AV . L . H . . EK L . . V . . G . . Q . . . . .        |
|                        | * * * * * *                                                                                                     |
| <i>H. sapiens</i>      | SLLGSRL EETLYSDQEL AYLQQGEEA MQKALGI LS NQEGWKKESQQDN GDKVM SKV                                                 |
| <i>M. musculus</i>     | . . . . . Q . . A . . . . . S . I . . . . V . . . . . N . . . . . E . . . . E . L . M                           |
| <i>X. laevis</i>       | I . . S . . . . KTLN . V . MS . I K . . . . . LK . S . N . . GD . D . . T . I VME . . . . . L . . .             |
| <i>L. catesbeianus</i> | . . . S . . . . KVFNEA . I S . I K . . Q . . LK . SMS . . GE . D . . V . I VAE . . . . . L . H                  |
| <i>G. rugosa</i>       | . . . S . . . . KVFNEA . I S . I K . . Q . . LK . SMS . . GE . D . . V . I VAE . . . . . L . . .                |
|                        | * * * * * *                                                                                                     |
| <i>H. sapiens</i>      | VPDVGK VFRLEVVDQP MERLYEELV ERMEAMGEWNP NVK EI KV LQKI GKDTFI TH                                                |
| <i>M. musculus</i>     | . . . . . D . . . . . D . . . . . . . . . . . R . . . . V . . .                                                 |
| <i>X. laevis</i>       | L . . I . . . . K . . A . . EK . LDNV . G . . . . . DN . K . . . . . V . I . . . . V . . .                      |
| <i>L. catesbeianus</i> | L . . I . . . . K . . A . . EK . LD . V . G . . . . . DN . S . . . . . I . R . . N . V . . .                    |
| <i>G. rugosa</i>       | L . . I . . . . K . . A . . ER . LD . V . G . . . . . DK . S . . . . . I . R . . N . V . . .                    |
|                        | * * * * * *                                                                                                     |
| <i>H. sapiens</i>      | ELAAEAAGNLVGP RDFV SVRC AKRRG STCVLAGMD TDFGN MPEQK GVI RAEHGPTC                                                |
| <i>M. musculus</i>     | . . . . A . . . . . . . . . . . T . . . . . . . . . . . A . H . . E . . . . S . . . . .                         |
| <i>X. laevis</i>       | . . K . . TP . . I . . A . . . . . S . . . . . I . . . . . S . R . . G . . . . FV . G . N . . . .               |
| <i>L. catesbeianus</i> | . . K . . T . . I . . . . . . . . . . . N . . . . . I . . . . . S . R . . G . . . . Y . . . N . . . .           |
| <i>G. rugosa</i>       | . . K . . T . . I . . . . . . . . . . . N . . . . . I . . . . . S . R . . G . . . . YV . . N . . . .            |
|                        | * * * * * *                                                                                                     |
| <i>H. sapiens</i>      | MVLHPLAGSPSKTKLTWLLSI DLKGWL PKSI I NQVLS QTQ VDFANHLR KRLESHPA                                                 |
| <i>M. musculus</i>     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . T . . . . . I E . . . . . AS . . . . .                                |
| <i>X. laevis</i>       | . . . R . . . EDI . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . K . . . S . MT . SSN                                |
| <i>L. catesbeianus</i> | . . . . VLED . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . K . . . S . VAMSSN                                       |
| <i>G. rugosa</i>       | . . . . VLED . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . K . . . S . VAMYSN                                       |
|                        | * * * * *                                                                                                       |
| <i>H. sapiens</i>      | SEARC                                                                                                           |
| <i>M. musculus</i>     | . . . Q .                                                                                                       |
| <i>X. laevis</i>       | ALSL                                                                                                            |
| <i>L. catesbeianus</i> | VSLC-                                                                                                           |
| <i>G. rugosa</i>       | VSLC-                                                                                                           |

**Figura 11:** Alineamiento de la secuencia aminoacídica completa de la proteína StAR de *H. sapiens* con las secuencias de *Mus musculus* (NP 035615.2), control positivo del anticuerpo, y *X. laevis* (NP 001167502.1), *L. catesbeianus* (ACJ53927.1), *Glandirana rugosa* (BAH09112.1), todas las secuencias de StAR de anfibios disponibles en la base de datos *on line*. Los códigos dentro de los paréntesis corresponden al número de acceso de la secuencia a la base de datos. Los asteriscos (\*) debajo de las alineaciones indican conservación del aminoácido.

Tal como se mencionara, para corroborar la identidad de la bandas se utilizaron como controles positivos las fracciones subcelulares de glándulas adrenales de ratón, según lo aconseja la hoja de datos del anticuerpo. Las validaciones se realizaron utilizando distintas fracciones subcelulares de glándulas interrenales y testículos de *R. arenarum*.

#### Mediciones por Western blot

La preparación de las muestras para su medición por Western blot consistió en tomar una determinada cantidad de proteínas correspondiente a cada fracción subcelular y adicionarle buffer de siembra (ver Soluciones y Buffers), hervirlas durante cinco

minutos y centrifugarlas a 12000 xg durante 2 minutos a 4°C. La cantidad de proteínas dependió del tejido y la fracción a utilizar. Para las pruebas con las distintas fracciones subcelulares y la validación del anticuerpos se utilizaron:

- Para las fracciones total, postnuclear, postmitocondrial y mitocondrial de la glándula interrenal y el testículo de *R. arenarum*, 80 µg de proteínas. Para la fracción mitocondrial también se utilizaron 40 µg de proteínas.
- Para las fracciones total, postnuclear, postmitocondrial y mitocondrial de la glándula adrenal de ratón, 10 µg de proteínas.

Luego de esto, las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida 12,5 % con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Además, en cada gel se sembraron marcadores de peso molecular coloreados, con un rango de peso molecular entre 10 y 170 kDa (PageRuler, Thermo scientific, EE.UU). La electroforesis se realizó a 130 V durante 120 minutos luego de la cual se transfirieron las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Thermo scientific, EE.UU) utilizando un sistema de transferencia húmeda, durante 90 minutos a 300 mA. Para corroborar la efectividad de la transferencia de las proteínas las membranas se tiñeron con rojo Ponceau que luego fue lavado con agua destilada. Con la finalidad de realizar en las membranas los bloqueos correspondientes, primero se colocaron en PBS-T (ver Soluciones y Buffers) con 3% de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos para bloquear peroxidasas endógenas. Finalizado ese tiempo y luego de un lavado breve con PBS-T, se bloquearon los sitios inespecíficos utilizando 5% de leche en polvo descremada en PBS-T durante 90 minutos. Las membranas se cortaron en la zona correspondiente tanto al peso molecular de StAR como al de los controles de carga, según la fracción analizada. Luego fueron lavadas brevemente en PBS-T e incubadas durante toda la noche utilizando el anticuerpo primario correspondiente a la proteína que se deseaba revelar. Luego de realizar distintas pruebas se determinó que la dilución a utilizar del anticuerpo anti StAR fuera de 0,4 µg/ml, preparada en 2% leche descremada en PBS-T. Para la fracción mitocondrial se utilizó durante una determinada cantidad de ensayos el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina (55 kDa) diluido en PBS-T con 2% de leche en polvo descremada, en una concentración de 4 µg/ml. Este anticuerpo fue obtenido en el Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biology, University of Iowa, EE.UU. Luego, se realizó una prueba con el anticuerpo anti la proteína GAPDH de 36 kDa, y se obtuvo que la banda revelada era menos difusa por lo que se decidió proseguir las mediciones con el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH de conejo (Ambion, Life Technologies, EE.UU). La concentración utilizada fue de 1

$\mu\text{g/ml}$  en PBS-T con 2% de leche en polvo descremada. El control de carga para el resto de las fracciones se realizó con la proteína  $\beta$ -actina de 43 kDa, para lo cual se utilizó un anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina cuyo antígeno es un péptido sintético correspondiente a  $\beta$ -actina citoplasmática (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU), en una dilución 0,125  $\mu\text{g/ml}$  en PBS-T con 2% leche en polvo descremada. En todos los casos se realizó el control negativo omitiendo en la incubación el anticuerpo primario. Todas las incubaciones y los lavados se realizaron con agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron brevemente con PBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente. Para la proteína StAR se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a HRP (Chemicon Internacional, EE.UU). La concentración utilizada fue de 0,152  $\mu\text{g/ml}$  en PBS-T. Para los controles de carga, el anticuerpo secundario utilizado fue, en ambos casos, anti IgG de ratón acoplado a HRP 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU). El lavado posterior a la incubación con el anticuerpo secundario fue en PBS-T durante 45 minutos. El revelado de las bandas se realizó mediante un sistema de quimioluminiscencia utilizando un buffer de revelado (ver Soluciones y Buffers) en un detector de quimioluminiscencia Fujifilm LAS-1000 y las imágenes se obtuvieron mediante el equipo Fujifilm Luminiscent Image. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageGauge (Fujiphoto film CO., LTD. Altura Software, Inc. EE.UU).

#### Cuantificación de andrógenos

La cuantificación de los andrógenos en el medio de cultivo se realizó por RIA tal como se detallara en el Capítulo 1.

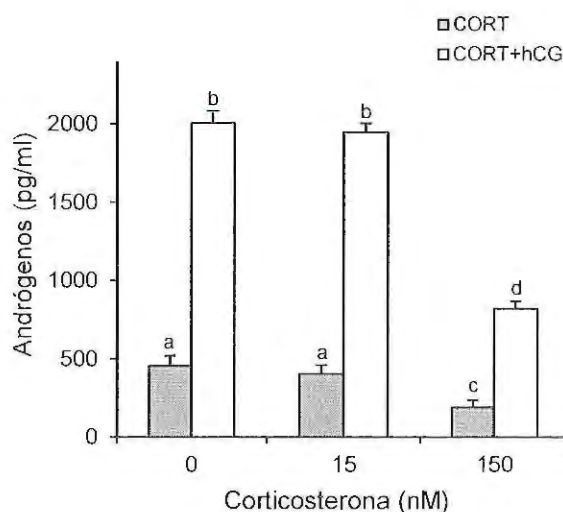
#### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar (EE) y se analizaron y compararon mediante un diseño de bloques aleatorizados, equivalente a un ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo. Para analizar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el test de Tuckey de comparaciones múltiples (Steel and Torrie, 1980). En todos los casos, cada sapo fue considerado como un bloque. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., OK, EE.UU). Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ . Previo al análisis estadístico se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad utilizando las pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente. Los valores de densidad óptica de las bandas relativizados a sus respectivos controles de carga fueron transformados aplicando el  $\ln(X)$  para corregir la heterocedasticidad.

## Resultados y Discusión

### Efecto de corticosterona sobre la secreción de andrógenos basal y estimulada por hCG

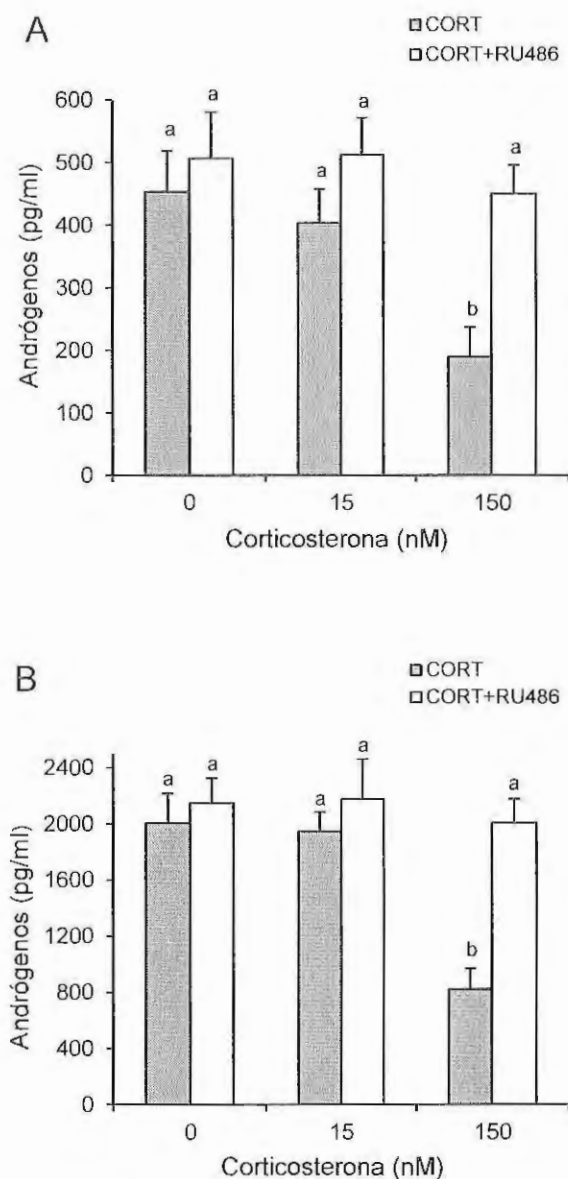
La figura 12 muestra los resultados obtenidos tanto para la secreción basal de andrógenos como para la estimulada por 20 UI de hCG, luego del pretratamiento por 24 horas con 15 y 150 nM de corticosterona. Como se desprende de la misma, tanto la síntesis de andrógenos basal como la estimulada disminuyen significativamente cuando previamente recibieron un tratamiento con corticosterona 150 nM. Esto muestra que una concentración fisiológica de GCs, correspondiente al período reproductivo de *R. arenarum*, es capaz de inhibir la síntesis de andrógenos en testículos de animales colectados durante el período no reproductivo, caracterizado por tener una alta producción de andrógenos (ver Figura 3 en la Introducción).



**Figura 12:** Efecto del tratamiento con corticosterona sobre la síntesis de andrógenos basal y estimulada por 20 UI/ml. La concentración de andrógenos está expresada como pg/ml. Los resultados están expresados como los valores promedios de  $n = 10 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$  CORT = Síntesis de andrógenos basal. CORT+hCG= Síntesis de andrógenos estimulada por hCG.

Por otra parte, la presencia de RU486, antagonista del GR, bloquea el efecto de 150 nM de corticosterona (Figura 13 A y B), confirmando que el efecto de esta hormona sobre la biosíntesis de andrógenos es mediado por ese receptor. El rol de RU486 como antagonista de GR se reportó previamente en otras especies de anfibios (Orchinik y col., 2000; Crespi y Denver, 2004). Además, en el testículo del sapo, se

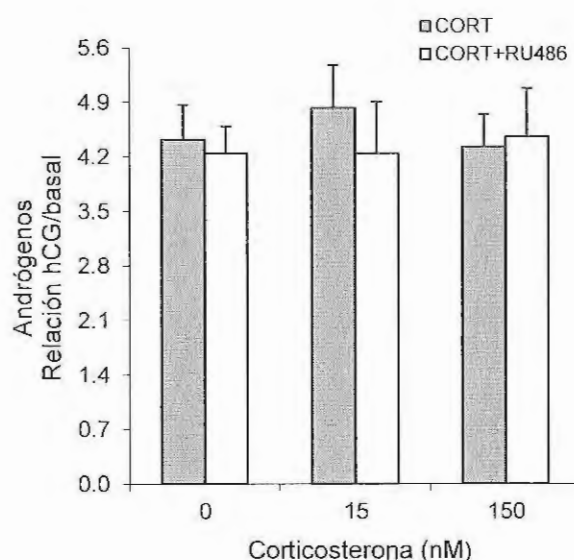
demostró que el RU486 desplaza la unión de dexametasona y corticosterona al GR (Denari y Ceballos, 2006).



**Figura 13:** Efecto del antagonista del GR, RU486, sobre la inhibición de la síntesis de andrógenos basal (A) y estimulada (B) evocada por 15 o 150 nM de corticosterona. La concentración de andrógenos está expresada como pg/ml. Los resultados están expresados como los valores promedios de  $n = 10 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ . CORT = Solo corticosterona. CORT+RU486 = Corticosterona más 10  $\mu M$  de RU486.

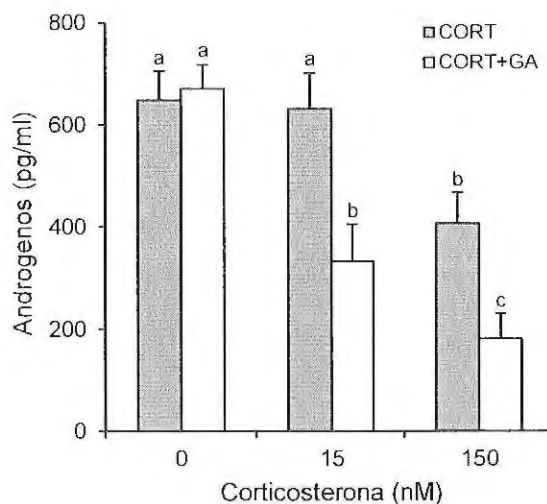
La inhibición de la síntesis de andrógenos por el pretratamiento con 150 nM de corticosterona no afecta la relación entre la producción estimulada por hCG y la

producción basal (Figura 14), lo cual sugiere que el receptor de la gonadotropina podría no estar afectado, aunque esto debería ser demostrado experimentalmente.



**Figura 14:** Relación entre la síntesis de andrógenos estimulada y basal, luego del tratamiento por 24 horas con distintas concentraciones de corticosterona (CORT) o distintas concentraciones de corticosterona más 10  $\mu$ M de RU486 (CORT+RU486). Los resultados están expresados como relación entre los valores promedio  $\pm$  EE.

Dado que trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron en el testículo la presencia de una isoforma de la enzima 11 $\beta$ -HSD con actividad oxidativa (Denari y Ceballos, 2005), se decidió analizar su participación en la modulación de la actividad glucocorticoidea. Para ello, los tratamientos con corticosterona se realizaron en presencia de AG, un inhibidor competitivo de la enzima 11 $\beta$ -HSD. Los resultados obtenidos muestran que la presencia del inhibidor incrementa la sensibilidad del testículo a la acción de corticosterona ya que con 15 nM del GC se observa una marcada disminución en la síntesis de andrógenos, disminución no observada en ausencia de AG (Figura 15). La presencia de AG también incrementa la magnitud del efecto inhibitor de 150 nM de corticosterona.



**Figura 15:** Efecto del ácido glicirretínico (AG) sobre la inhibición de la síntesis de andrógenos basal evocada por 15 o 150 nM de corticosterona. La concentración de andrógenos está expresada como pg/ml. Los resultados están expresados como los valores promedios de  $n = 10 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ . CORT = Solo corticosterona. CORT+AG = Corticosterona más 1,5  $\mu M$  de AG.

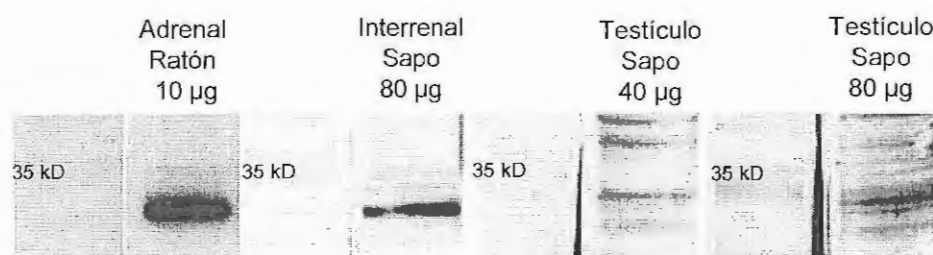
Estos resultados sugieren que la enzima  $11\beta$ -HSD cumple un papel importante en la modulación del efecto glucocorticoideo a nivel testicular, como se describió previamente en la rata (Gao y col., 1996; Gao y col., 1997). Dado que los GCs afectan la síntesis de esteroides vía el GR y que la enzima  $11\beta$ -HSD modula la actividad glucocorticoidea, es importante tener en cuenta la localización intratesticular del receptor y su asociación con la actividad de  $11\beta$ -HSD. En el sapo, el GR se encuentra en las células de Leydig así como en las células de Sertoli (Denari y Ceballos, 2006), una localización dual comparable con la distribución intratesticular descrita en la rata (Evain y col., 1976; Levy y col., 1989). En la mayoría de los tejidos blanco de GC, como hígado y pulmón, la  $11\beta$ -HSD tipo 1 funciona principalmente como una reductasa (Seckl y Walker, 2001), mientras que en las células de Leydig de rata el potencial redox favorece la actividad oxidativa (Ge y Hardy, 2000). Los experimentos realizados por Hu y col. (2008) sugirieron que existe un acoplamiento entre la actividad de deshidrogenasa de  $11\beta$ -HSD y las enzimas dependientes de NADPH implicadas en la biosíntesis de testosterona. El  $NADP^+$  generado por la esteroidogénesis podría estimular la actividad oxidativa de la  $11\beta$ -HSD. Sin embargo, esto no sería aplicable en el sapo ya que la  $11\beta$ -HSD expresada en las células de Leydig es una isoforma dependiente de  $NAD^+$  similar a la enzima tipo 2 de los mamíferos (Denari y Ceballos, 2005) y, además, el tratamiento con GC por períodos cortos no afecta la producción de

andrógenos (datos no mostrados). Por otra parte, los resultados obtenidos también permiten proponer que la actividad oxidativa de la mencionada enzima es la que determina que las concentraciones de GC correspondientes al período no reproductivo no afecten la producción de andrógenos, que en dicho período es muy elevada (Fernández Solari y col., 2002; Denari y Ceballos, 2005)

Dados estos resultados, se planteó entonces la posibilidad de que el efecto de corticosterona sobre la síntesis de andrógenos pudiera estar dado por la inhibición de la proteína StAR, responsable del suministro de colesterol a la enzima Cyp450scc, paso limitante y hormonalmente regulable de la síntesis de esteroides. Para analizar la propuesta se decidió determinar, en primer lugar, el efecto de los estimuladores de la esteroidogénesis sobre StAR, para luego evaluar el rol de los GCs sobre la síntesis basal y estimulada de la proteína.

#### Validación del anticuerpo anti StAR

Para todos los estudios se utilizó el anticuerpo anti StAR ya mencionado. Luego de distintos ensayos realizados con el homogenato total y las fracciones post-nuclear, post-mitocondrial y mitocondrial, se eligió trabajar con la fracción mitocondrial dado que sólo con esta fracción se obtuvieron resultados repetibles y cuantificables. El uso de la fracción mitocondrial se verificó también en distintos trabajos científicos en los que se realizaron Western blots para cuantificar la proteína (Arakane y col., 1996; Townson y col., 1996; Kim y col., 2009). El anticuerpo anti StAR permitió detectar en la fracción mitocondrial una banda inmunoreactiva de aproximadamente 28 kDa, tanto en adrenal de ratón, control positivo, como en interrenal y testículo de sapo (Figura 16).



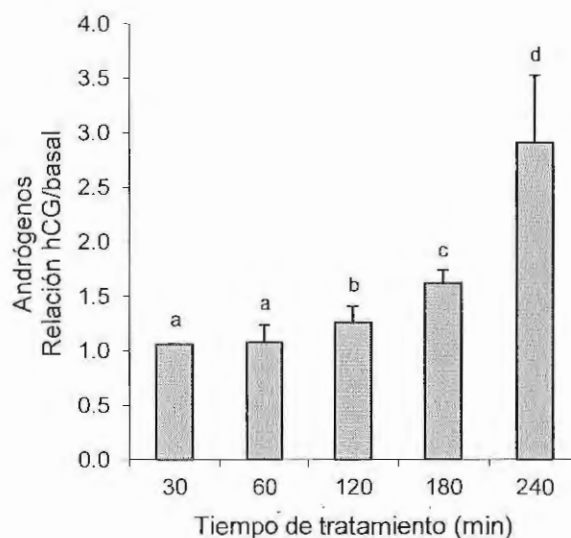
**Figura 16:** Revelado de membranas de Western blot donde se observa la banda inmunoreactiva de StAR, de alrededor de 28 kDa, obtenida en la fracción mitocondrial, por debajo de la banda correspondiente 35 kDa, indicada por el marcador de peso molecular. Control positivo: adrenal de ratón. La misma banda es evidente en las fracciones mitocondriales de interrenal y de testículo de *R. arenarum*.

El análisis de estos resultados permite concluir que, tal como se podía inferir de los resultados del alineamiento mostrados en la figura 11, el anticuerpo dirigido contra la proteína de *H. sapiens* también reconoce a la proteína de *R. arenarum*. Al comparar la banda obtenida a partir de adrenal de ratón con las reveladas a partir de interrenal y testículo de sapo podemos observar mayor intensidad de la banda en ratón con menor cantidad de proteínas (10 µg). Esto se debe a que la secuencia aminoacídica de ratón es mucho más parecida a la de humanos que las secuencias de los anfibios. En el caso de la interrenal de sapo podemos ver que se obtiene una banda más intensa que para el testículo y esto estaría asociado con la mayor cantidad de células esteroideogénicas presentes en este tejido en relación a las células totales (Regueira y col., 2013a). Con esto corroboramos la importancia de haber incluido a la glándula interrenal para el ajuste de las condiciones en se debían hacer las determinaciones por Western blot y la validación del anticuerpo.

#### Tratamientos *in vitro* de fragmentos testiculares

En trabajos previos del laboratorio, así como en el Capítulo 1 de esta tesis, se mostró que 2 horas es un tiempo adecuado de tratamiento con hCG para obtener diferencias significativas en la producción de andrógenos con respecto al control sin hCG (Canosa y Ceballos, 2002a). Además, se observó que a partir de las 8 horas de tratamiento la síntesis de andrógenos se mantenía constante. Por otra parte, también se había demostrado que tratamientos por 2 horas con distintas dosis de hCG (de 2,5 a 100 UI/ml), saturaban la respuesta en la síntesis de andrógenos con 10 UI/ml de la gonadotropina (Pozzi y col., 2006).

Con estos antecedentes, se decidió realizar curvas de tiempo para determinar la producción de andrógenos *in vitro* estimulada por 40 UI/ml de hCG. Decidimos utilizar esta concentración de hCG, por encima de la que produce una estimulación máxima, para que la gonadotropina no sea un factor limitante en los experimentos. Los resultados de la síntesis de andrógenos estimulada por 40 UI/ml en función del tiempo muestran que a las 2, 3 y 4 horas la producción estimulada de andrógenos es significativamente mayor que la producción basal en esos mismos tiempos de tratamiento (Figura 17).



**Figura 17:** Síntesis de andrógenos inducida por 40 UI de hCG en función del tiempo de tratamiento. Los resultados obtenidos luego del tratamiento con hCG están relativizados al valor correspondiente a cada tiempo sin estimulación. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n = 6 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ . Min = minutos.

Lamentablemente, no fue posible cuantificar a la proteína StAR en cada tiempo de incubación debido a que la cantidad de proteína obtenida no permitió el revelado en el Wester blot. Para la selección del tiempo de tratamiento decidimos utilizar referencias bibliográficas.

Antes que la proteína StAR fuera caracterizada como reguladora de la estimulación aguda de la esteroidogénesis (Clark y col., 1994), ya se conocía que la respuesta de las células esteroidogénicas a la estimulación con la hormona trófica era un aumento rápido en la biosíntesis de la hormona correspondiente (Haynes y col., 1959; Karaboyas y Koritz; 1965). Además, se sabía que la esteroidogénesis era dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (Jefcoate y col., 1986), proteínas que facilitaban la translocación del colesterol a la membrana interna mitocondrial y luego a la matriz mitocondrial (Stone y Hechter, 1954; Jefcoate y col., 1987). La figura 17 muestra que a partir de las 2 horas hay un cambio significativo en la cantidad de andrógenos producidos lo que lleva a pensar que antes de este tiempo, o simultáneamente, debería haber un cambio en la cantidad de StAR con respecto al control sin estimular. Por otra parte, se observa que la síntesis de andrógenos continua aumentando con respecto al control a las 4 horas de tratamiento (Figura 17), lo que permite suponer que la cantidad de proteína podría mantenerse elevada durante ese tiempo. En

concordancia con nuestro razonamiento, los resultados de los primeros trabajos realizados en células tumorales de Leydig, MA-10, por Stocco y Sodeman en el año 1991, detallan que después de 1 hora de estimulación hormonal las proteínas mitocondriales de 30 y 32 kDa se encuentran en un nivel muy alto y se mantienen durante 4 horas.

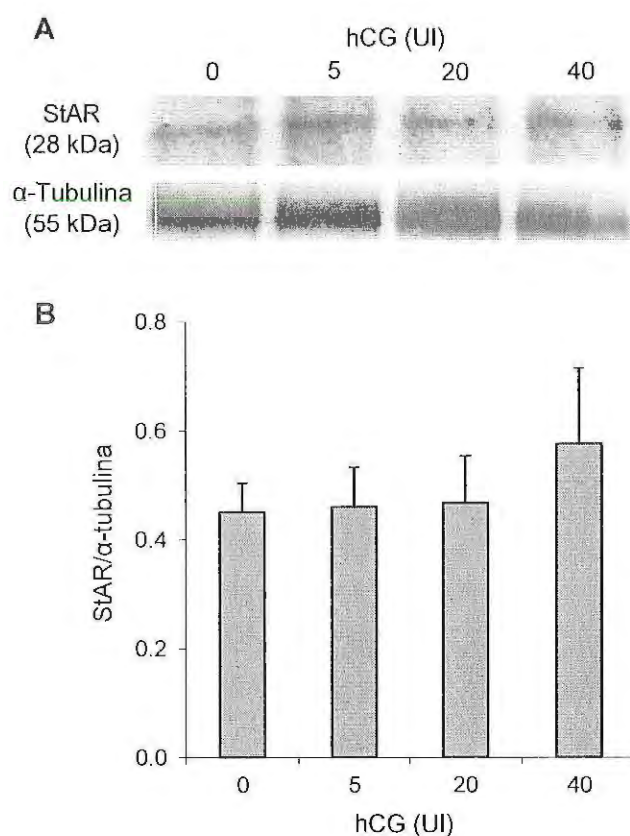
Un año después del clonado y caracterización de StAR, Clark y col. (1995) mostraron que el tratamiento de las células MA-10 con AMPc imitaba los efectos de la gonadotropina LH, tanto sobre la producción de esteroides como sobre la síntesis de StAR. Los autores observaron que a las 2 horas aumentaba notablemente el ARNm y los niveles máximos se detectaban entre las 4 y las 6 horas después del inicio del tratamiento. Además, la expresión de StAR se detectaba también después de 2 horas de tratamiento con AMPc en tanto que los valores máximos de expresión se observaban a las 8 horas. Años más adelante, un trabajo de Manna y col. (2004) mostró la respuesta al estímulo de hCG en la expresión del ARNm de StAR en células de Leydig de ratón (mLTC-1). En este trabajo se observó que a partir de la hora se medían valores significativamente diferentes del ARNm, alcanzando su máxima expresión a las 4 horas.

Mucho más difícil fue tratar de encontrar criterios comunes en cuanto a los tiempos de tratamiento cuando se pasó de analizar los resultados de los estudios en líneas celulares a tratamientos *in vitro* e *in vivo* en vertebrados, mamíferos o no mamíferos. Dentro de los vertebrados no mamíferos, muchos de los trabajos apuntan a estudiar el efecto del estrés o del tratamiento con ACTH sobre la expresión del mensajero de StAR en la glándula interrenal. Li y col. (2003) observaron que inyecciones de ACTH en anguila permitían ver cambios en la expresión del mensajero de StAR a partir de la hora y media, y el máximo de expresión a las 4 horas y media post inyección. Entre los trabajos que buscaron medir la expresión de StAR en gónadas se encuentra el de Nunez y Evans (2007). En dicho trabajo se realizaron tratamientos con hCG *in vitro* en testículos del actinopterio *Micropogonias undulatus* y se midió la expresión de StAR a las 6 y las 24 horas post inicio del tratamiento. Por otra parte, en *Clarias gariepinus* se obtuvieron aumentos significativos en la expresión del ARNm de StAR en folículos ováricos, en estudios *in vitro* e *in vivo*, entre las 2 y las 4 horas (Sreenivasulu y col., 2009).

Con estas referencias y teniendo en cuenta el aumento significativo en la síntesis de andrógenos en *R. arenarum* entre las 2 y 4 horas, se decidió realizar los tratamientos durante 2 y 4 horas para garantizar una estimulación adecuada.

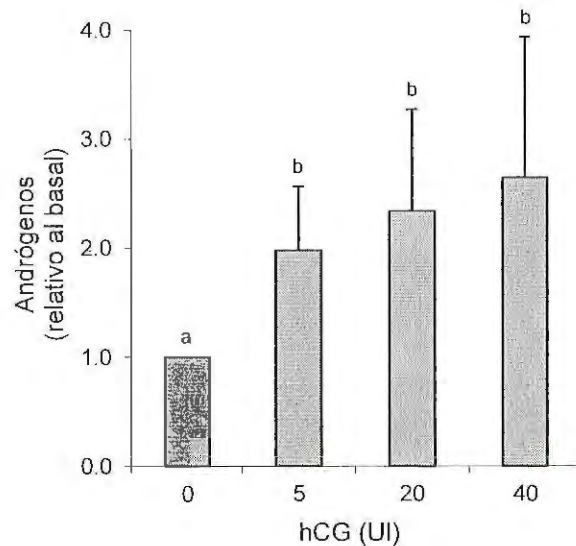
### Efecto de hCG sobre la síntesis de StAR

Con el objetivo de analizar el efecto del tratamiento *in vitro* con hCG sobre la síntesis testicular de StAR, se realizaron los experimentos detallados en Materiales y Métodos y las semicuantificaciones de la proteína luego de los Western blots. La figura 18 detalla los resultados obtenidos luego del tratamiento con distintas dosis de hCG durante 4 horas. La figura 18 A muestra un western blot representativo en tanto que en la figura 18 B se observa que no hay diferencias significativas en la cantidad de proteína con respecto al control sin hCG, independientemente de la concentración de gonadotrofina utilizada. Sin embargo, parecería haber cierta tendencia al aumento cuando se utilizan 40 UI/ml (Figura 18 B). Resultados similares se obtuvieron luego de 2 horas de tratamiento (datos no mostrados).



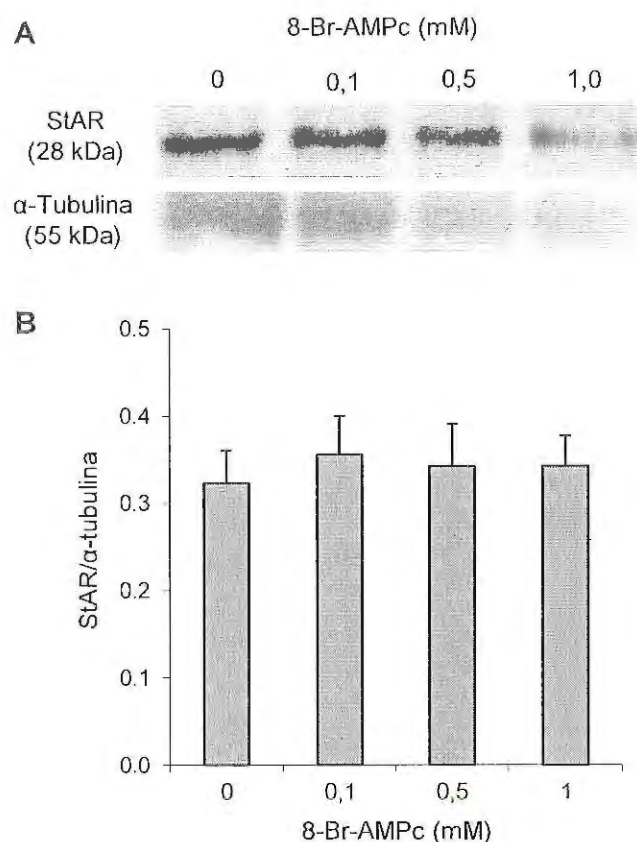
**Figura 18:** Efecto del tratamientos con distintas concentraciones de hCG sobre la cantidad de StAR. El panel A muestra la fotografía de una membrana de Western blot de un experimento representativo. El panel B muestra el análisis densitométrico de la banda de 28 kDa correspondiente a StAR. Los valores de StAR fueron normalizados al correspondiente valor de α-tubulina. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n=5 \pm EE$ .

En cambio, la síntesis de andrógenos, utilizada como control experimental, mostró cambios significativos para todas las concentraciones de hCG utilizadas (Figura 19). Esto último es algo que llama la atención dado que el incremento en la producción de andrógenos no parece estar asociado a un aumento de la proteína encargada de transportar colesterol a la membrana interna mitocondrial.



**Figura 19:** Síntesis de andrógenos inducida por distintas concentraciones de hCG. Los resultados obtenidos luego del tratamiento con hCG están relativizados al valor control, sin hCG. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n=5 \pm EE$ . Letras diferentes significan valores estadísticamente significativos  $p < 0,05$ .

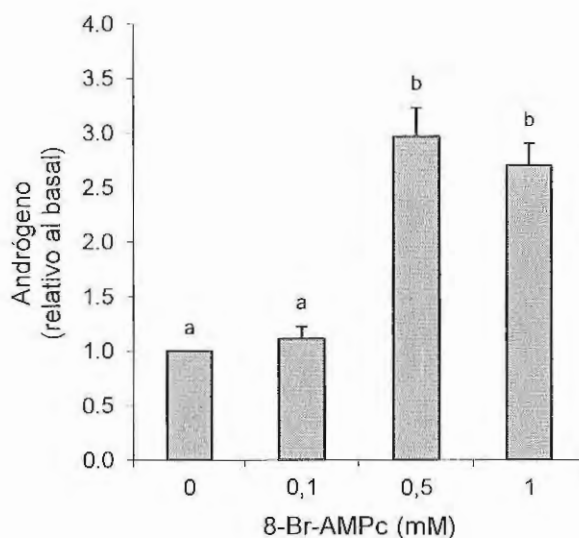
Por otra parte, el tratamiento con dosis crecientes de 8-Br-AMPC tampoco mostró cambios significativos en la proteína y, a diferencia de lo ocurrido con hCG, no se observó siquiera una tendencia al aumento con la dosis máxima del activador de PKA (Figura 20 A y B).



**Figura 20:** Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de 8-Bromo adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-AMPC). El panel **A** muestra la fotografía de una membrana de Western blot de un experimento representativo. El panel **B** muestra el análisis densitométrico de la banda de 28 kDa correspondiente a StAR. Los valores de StAR fueron normalizados al correspondiente valor de  $\alpha$ -tubulina. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n=6 \pm EE$ .

En cambio, la síntesis de andrógenos aumentó significativamente a partir de la concentración 0,5 mM (Figura 21).

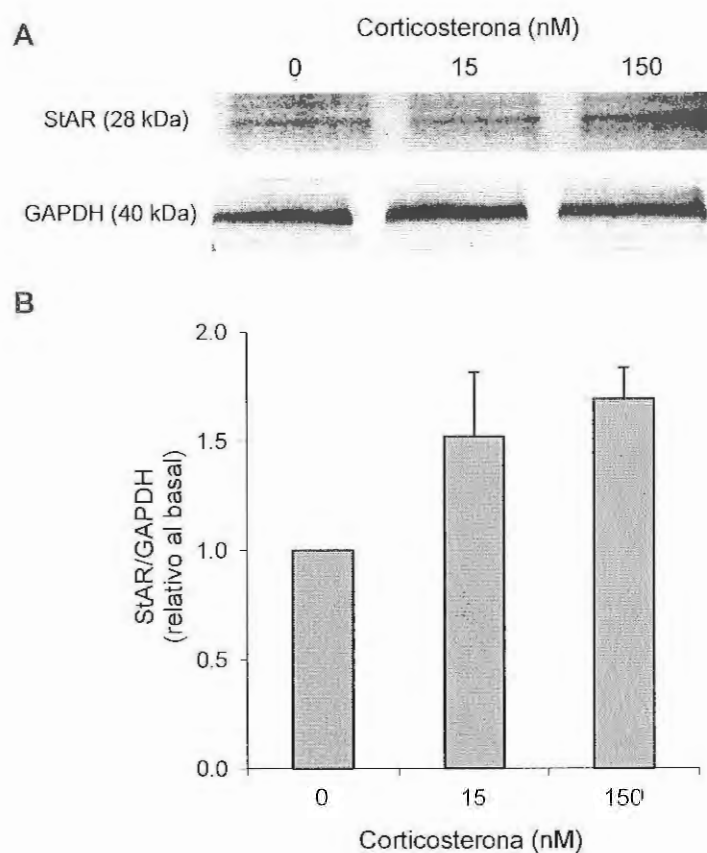
Ya se había sugerido, en trabajos previos del laboratorio, que el efecto de hCG sobre la esteroidogénesis podría ser independiente de PKA dado que la esteroidogénesis estimulada por hCG no era inhibida por H89, un inhibidor de dicha quinasa. Si bien la síntesis de andrógenos es estimulada por 8-Br-AMPC, con el cual se activa la PKA, podría ocurrir que dicha quinasa fuera parte de otra vía por la que pudiera estimularse la esteroidogénesis, vía no activada por hCG (Tesis Licenciatura Volonteri, 2009).



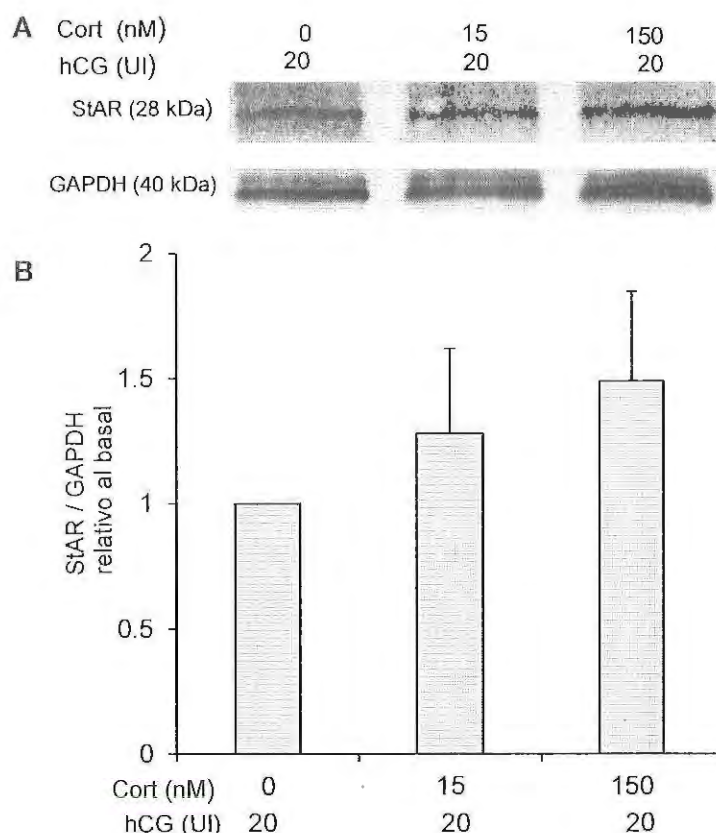
**Figura 21:** Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de 8-Br-AMPC sobre la síntesis de andrógenos. Los valores están relativizados al control sin 8-Br-AMPC. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n=6 \pm EE$ . Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control con  $p < 0,05$ .

Aunque no se logró mostrar un aumento en la síntesis de StAR en los tratamientos con hCG y 8-Br-AMPC, se decidió continuar los estudios para analizar si el efecto de los GCs disminuían dicha síntesis. Esta decisión estuvo basada en los resultados del trabajo realizado por Huang y Li (2001), en cultivos de folículos preovulatorios de rata y por el de Martin y Tremblay (2008) en cultivos de células de Leydig, en los cuales se muestra que los GCs inhiben la expresión de StAR estimulada por gonadotrofinas o AMPc. Además, la inhibición en la producción de esteroides por corticosterona, mostrada en este capítulo, podría ser debida a que uno de los pasos afectados fuera el del transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial, modificando por ejemplo, la síntesis de StAR.

Los resultados de los experimentos en los cuales se analizó el efecto de corticosterona sobre la síntesis basal de StAR (Figura 22 A y B) o estimulada por hCG (Figura 23 A y B) muestran que no existen cambios significativos en la producción de la proteína. Sin embargo, se observa claramente una tendencia al aumento, resultado muy difícil de explicar con los datos que se tienen hasta el momento.



**Figura 22:** Efecto del tratamiento con distintas dosis de corticosterona (15, 150 nM) durante 24 horas sobre la expresión basal de StAR. Transcurrido el periodo de tratamiento los fragmentos de testículos se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. El panel A muestra la fotografía de una membrana de Western blot de un experimento representativo. El panel B muestra el análisis densitométrico de la banda de 28 kDa correspondiente a StAR. Los valores de StAR fueron normalizados al correspondiente valor de GAPDH. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n = 6$  animales  $\pm$  EE, referidos al control sin corticosterona.



**Figura 23:** Efecto del tratamiento durante 24 horas con distintas dosis de corticosterona (15, 150 nM) sobre la síntesis de StAR estimulada por hCG. Luego de transcurrido el tiempo de incubación los fragmentos de testículos se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. El panel A muestra la fotografía de una membrana de Western blot de un experimento representativo. El panel B muestra el análisis densitométrico de la banda inmunoreactiva de StAR de 28 kDa. Los valores de StAR fueron normalizados al correspondiente valor de GAPDH. Los resultados se expresan como el valor promedio de  $n = 6$  animales  $\pm$  EE, referidos al control sin corticosterona.

Por lo tanto, la disminución en la síntesis de esteroides provocada por los GCs podría estar relacionada exclusivamente con la disminución de la actividad de la enzima Cyp450<sub>c17</sub> descrita para esta especie (Czuchlej y col., 2018).

En conclusión, independientemente de lo ocurrido con la síntesis de andrógenos, la síntesis de StAR no se estimula significativamente con ninguno de los tratamientos realizados. Esto resultó llamativo ya que el aumento en la síntesis de esteroides no correlaciona con un incremento significativo en la proteína StAR. Para tratar de explicar estos resultados se plantearon distintas opciones. La primera de ellas es que la medición por la técnica de Western blot, una técnica semicuantitativa, y el uso de un anticuerpo no específico para la proteína de *R. arenarum* dificultaran la detección de variaciones significativas en la proteína. El hecho de que los trabajos donde se mide la

síntesis de la proteína se hayan realizado en líneas de células esteroideogénicas y que otros trabajos realizados *in vivo* e *in vitro* midan la expresión del ARNm de StAR, refuerza la opción planteada.

Otra posibilidad es que el movimiento de colesterol necesario para la síntesis de esteroides se realice con otra proteína transportadora, que comparta dominios de unión al colesterol, como ocurre con la proteína MLN64 (Watari y col., 1997).

Una tercera posibilidad es que en el testículo del sapo ocurra algo semejante a lo que pasa en la placenta humana, en la cual el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial no es el sitio de regulación más importante debido a que las mitocondrias placentarias poseen una concentración de colesterol cercana a la saturación (Tuckey, 2005). Debido a esto, no existe en la placenta regulación aguda de la síntesis de esteroides. Si bien parece poco probable que el funcionamiento placentario se asemeje al del testículo de *R. arenarum*, no es la primera vez que se encuentran semejanzas. Por ejemplo, al igual que en la placenta humana el testículo de sapo tiene la enzima 3 $\beta$ HSD/I en dos localizaciones, mitocondria y retículo endoplásmico (Pozzi y col., 1997).

Ante la poca información acerca de la proteína StAR de anfibios y con el objetivo de determinar si los resultados obtenidos se debían a problemas de sensibilidad se decidió realizar la caracterización molecular de StAR así como la expresión de su mensajero en el testículo de *R. arenarum*.

## V Capítulo 3

## Capítulo 3. Análisis molecular de la proteína StAR

En el Capítulo 2 de esta tesis se describió que los GC no afectan significativamente la síntesis de la proteína StAR, aunque lo más sorprendente fue encontrar que ni hCG ni 8-Br-AMPc estimulan su producción. Como consecuencia, la caracterización molecular de la proteína StAR fue necesaria debido no sólo a la poca información que existe en anfibios y a la necesidad de contar a futuro con anticuerpos confiables sino también para determinar si la falta de efecto de la gonadotrofina y 8-Br-AMPc era debida a problemas de sensibilidad. Para ello, fue necesario obtener la secuencia completa de la proteína lo que, de manera adicional, permitió realizar estudios filogenéticos que llevaron a esclarecer un poco más las distancias filogenéticas y la divergencia de esta proteína a lo largo de la evolución de los distintos grupos de vertebrados.

### Materiales y Métodos

#### Animales

Se utilizaron sapos machos adultos de la especie *R. arenarum* recolectados a lo largo de todo el año en la provincia de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos y alimentados como se describió en el Capítulo 1.

#### Obtención del material biológico

Para la obtención de los testículos y las glándulas interrenales, los animales se anestesiaron y procesaron como se describió en el Capítulo 1. Además, para los estudios de especificidad de expresión del ARN mensajero (ARNm) de StAR se aislaron otras estructuras como órgano de Bidder, cerebro, piel, riñón y corazón.

#### Secuenciación del mensajero de StAR

Para la caracterización molecular de la proteína StAR se decidió trabajar en primer lugar con las glándulas interrenales dado que las mismas, como ya se mencionara, tienen una muy alta proporción de células esteroideogénicas (Regueira y col., 2013a) en comparación con el testículo, en el que dichas células quedan reducidas al tejido interlobular (Pudney, 1998; Pozzi y Ceballos, 2000). Con el fin de obtener la secuencia del ARNm de la proteína StAR se procedió como se detalla a continuación.

#### Extracción y cuantificación del ARN total

El área de trabajo y el material a utilizar para la extracción del ARN total se trató con RNasa ZAP (Sigma, EE.UU). Siempre se utilizaron guantes y todo el material era libre de ARNasas y ADNasas.

El ARN total de las glándulas interrenales se extrajo utilizando el método de Tiocianato de Guanidinio-Fenol-Cloroformo (TRIzol Reagent, Life Technologies, EE.UU). Para ello se pesaron las glándulas interrenales y se las homogeneizó con TRIzol (1 ml por 50-100 mg de tejido) utilizando un homogenizador PRO 200 (Pro Scientific, EE.UU). El homogenato se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se agregaron 0,2 ml de cloroformo. Luego de mezclarlo vigorosamente se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos. La fase acuosa que contiene el ARN total se separó en un tubo Eppendorf, se precipitó utilizando 0,5 ml de isopropanol y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con alcohol 70° preparado con agua DEPC (ver Soluciones y Buffers). Luego, el ARN total se resuspendió en agua DEPC, incubándolo durante 10 minutos a 55°C. Al finalizar, se lo guardó a -80°C hasta su utilización.

La integridad del ARN se constató luego de una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE (ver Soluciones y Buffers), durante 15 minutos a 100 V. El ARN se visualizó mediante irradiación con luz ultravioleta en un equipo Fujifilm Luminiscent Image, utilizando SYBR® green (Life Technologies, EE.UU) para la tinción del ARN en el gel. La visualización de las dos bandas de ARN ribosomal correspondientes a las dos subunidades del ribosoma se estableció como condición óptima del estado del ARN. Luego de esto se cuantificó el ARN total por fluorescencia utilizando un fluorómetro Qubit (Invitrogen, EE.UU).

#### Transcripción reversa (RT)

Luego de la extracción, y previo a la transcripción reversa, todas las muestras se pre-trataron con ADNasa I libre de ARNasas con el fin de eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Para ello, el ARN total a utilizar se trató con ADNasa RQ1 (Promega, EE.UU) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo incubando a 65°C durante 10 minutos con 1 µl de solución detenedora de ADNasa (Promega).

Para obtener el ADN copia (ADNc), del ARN total se tomaron 2 µg al que se le agregaron 0,5 µg del primer oligo (dT) de secuencia 5'-TTT TTT TTT TTT TTT-3' (Biodynamics, EE.UU), en un volumen final de 10 µl. Esta preparación se incubó a 70°C por 5 minutos, se enfrió en hielo durante 5 minutos, después de lo cual se le agregaron 5 µl de buffer de transcripción para la enzima transcriptasa reversa AMV (Promega, EE.UU), 0,25 µl de una mezcla de dNTPs (25 mM cada uno), 40 U de inhibidor de ARNasa (Roche, Alemania), 30 U de la enzima AMV y agua DEPC hasta completar un volumen de 25 µl. La preparación se incubó a 48°C durante 45 minutos en un equipo termociclador PCR Sprint (Thermo Scientific, EE.UU) y, posteriormente, a 95°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa.

PCR (Reacción en cadena de la ADN polimerasa) degenerada de StAR

Una vez obtenido el ADNc total, se realizó una PCR degenerada para obtener un fragmento interno de la secuencia del ARNm de StAR, específico para *R. arenarum*. Para ello se utilizaron primers obtenidos a partir de secuencias de ARNm de StAR de otras especies. Los primers degenerados utilizados en esta tesis se obtuvieron de un trabajo publicado, realizado en *L. catesbeianus* (Seung-Chang y col., 2009).

Secuencias de primers degenerados utilizados:

Forward StAR        5'- CCT GCM ACH TTC AAR YTS TG -3'

Reverse StAR        5'- ACA AMT CCC YTC TGY TCV GGC AT -3'

Código IUB: **A**: Adenina; **C**: Citosina; **G**: Guanina; **T**: Timidina; **R** = AG, **Y** = CT, **M** = AC, **S** = GC, **B** = CGT, **H** = ACT, **V** = ACG.

La mezcla de reacción de la PCR consistió en: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 1 µM de cada primer degenerado (forward y reverse), 1,25 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega, EE.UU), la mitad del ADNc obtenido de la RT-PCR y agua miliQ hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la PCR fueron:

- 1 ciclo de 5 minutos a 94°C,
- 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización); 30 segundos a 58°C, (hibridación); 30 segundos a 72°C (extensión),
- 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

El producto de la PCR degenerada se separó por electroforesis preparativa en gel de agarosa 2% en buffer TAE, durante 25 minutos a 120 V. Como resultado, se obtuvo un fragmento amplificado de aproximadamente 600 pares de bases (pb) que luego de la electroforesis se recortó y separó del resto del gel. Este fragmento se purificó, extrayéndoles los restos de agarosa, utilizando el kit Accuprep (Bioneer, República de Corea). El kit consta de una columna de unión a ADN y distintos buffers de unión, de lavado y de elusión, que se utilizaron según consta en el protocolo propuesto por el fabricante. Posteriormente, se cuantificó el ADNc por fluorescencia. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación de ADN, Unidad de Biotecnología, INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina. La secuencia obtenida se comparó contra secuencias que se encuentran en una base de datos *on line*, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang y col., 2000). El algoritmo del programa encuentra las secuencias de la base de datos que

tienen mayor parecido a la secuencia ingresada. El resultado mostró que la secuencia obtenida en la secuenciación del producto de la PCR degenerada alineaba con fragmentos del ARNm de la proteína StAR de otras especies, con un alto grado de identidad con secuencias de anfibios, lo cual permitió inferir que la secuencia parcial obtenida hasta ese momento podría corresponder a la del ARNm de StAR de *R. arenarum*. A partir de esto, se confeccionaron primers específicos. Para diseñar estos primers se utilizó el programa DNAMAN (Huang y Zhang, 2003), teniendo en cuenta que no existiera complementariedad de bases ni intra ni inter primers y que las temperaturas de fusión fueran similares. Estos primers se utilizaron para obtener la secuencia nucleotídica completa del ARNm de StAR por medio de la técnica de amplificación de los extremos 5' y 3', denominada 5' y 3' RACE, por sus siglas en inglés (Rapid Amplification of cDNA Ends).

#### Amplificación de los extremos 3' y 5'

Para realizar la amplificación de los extremos 3' y 5' de ARNm se utilizó el kit GeneRacer (Invitrogen, EE.UU). Esta técnica se basa en adicionar a cada extremo del ARNm de secuencia desconocida un oligonucleótido conocido que sirva de primer. Cada una de las secuencias adicionadas tendrá como par, para la reacción de amplificación, los primers específicos de StAR (ver Resultados y Discusión.), diseñados a partir de la secuencia interna del mensajero obtenida de la PCR degenerada.

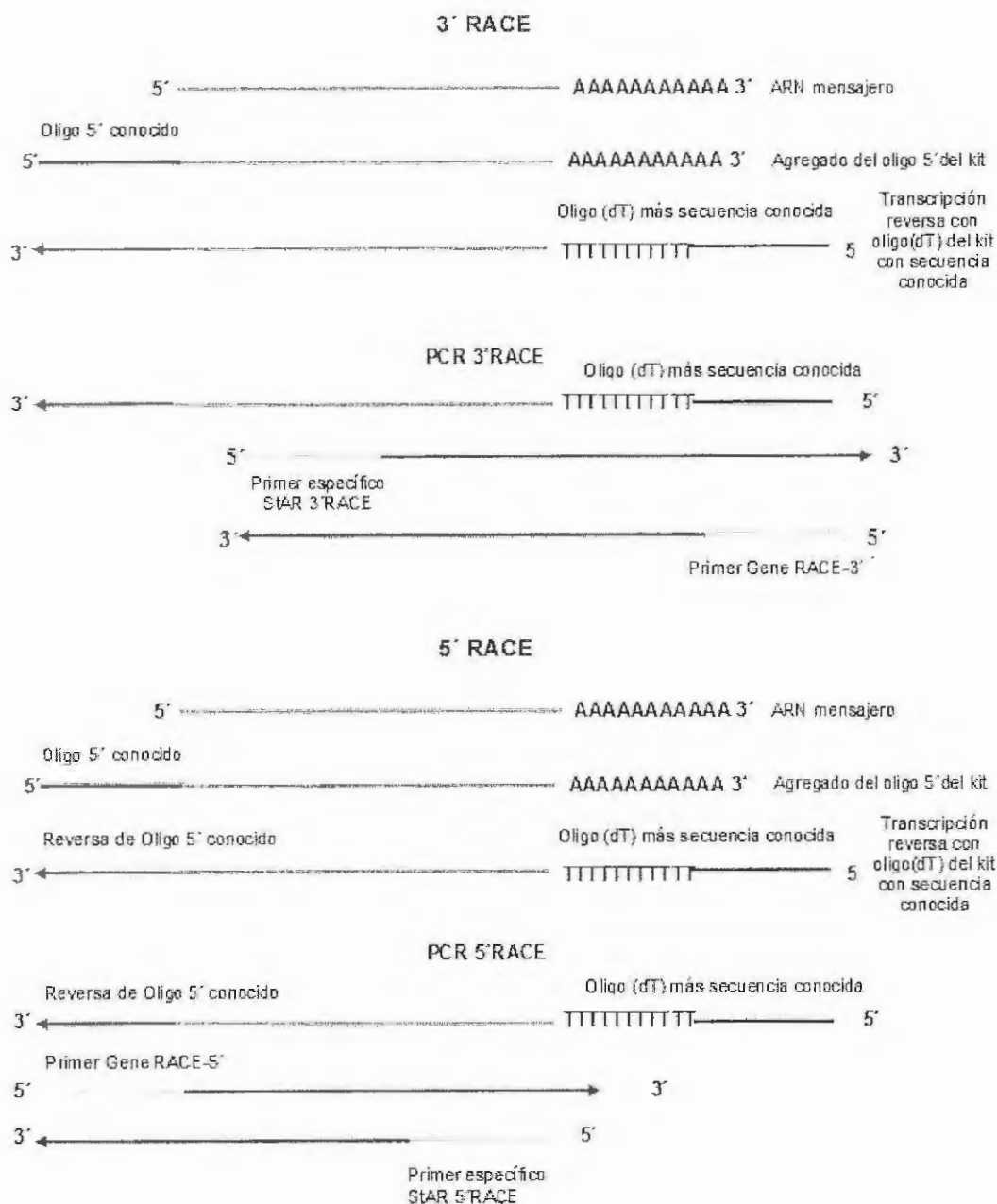
Los ARN que posean una modificación post-traducciona en el extremo 5' podrán incorporar el oligonucleótido de secuencia conocida. La modificación en dicho extremo se denomina capuchón o CAP en inglés, y consiste en un nucleótido de guanosina modificado, la 7-metilguanosa trifosfato, adicionado al extremo 5' de los transcritos primarios para su correcta identificación por el ribosoma. Primero, mediante la enzima fosfatasa intestinal de ternero, se remueven los fosfatos del extremo 5' de los ARNs que no posean capuchón. En un segundo paso, la enzima pirofosfatasa ácida de tabaco remueve 2 de los 3 fosfatos del CAP, dejando un fosfato libre solamente en los ARNm maduros que poseían CAP. Finalmente, con la enzima ARN ligasa se liga al extremo 5' de estos mensajeros el oligonucleótido de secuencia conocida:

5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'

Luego de dichos tratamientos se realiza una transcripción reversa para obtener ADNc, para lo cual se utiliza el primer oligo (dT) provisto por el kit de secuencia que se detalla a continuación:

5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)18-3'

Estas secuencias son a las que se unirán los primers que trae el kit, que se agregan junto con los primers específicos diseñados para *R. arenarum* durante las PCRs 3'RACE y 5'RACE. En la figura 24 se muestra un esquema de la amplificación de los extremos 3' y 5' por medio de la técnica RACE.



**Figura 24:** Esquema de la amplificación de los extremos 3' y 5' mediante la técnica 3' - 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Todas las reacciones de PCR tuvieron la siguiente composición: 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,33  $\mu M$  de cada primer interno; 1  $\mu M$  de cada primer provisto por el kit, 1,25 U de ADN polimerasa *GoTaq* y el ADNc proveniente de la transcripción reversa realizada utilizando el oligo(dT) del kit de la RACE, en un volumen final de 25  $\mu l$ .

Las condiciones para las PCRs fueron:

- 1 ciclo de 5 minutos a 94°C,
- 5 ciclos de: 30 segundos a 94°C; 40 segundos a 74°C,
- 5 ciclos de: 30 segundos a 94°C; 40 segundos a 72°C,
- 25 ciclos de: 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 68°C; 40 segundos a 70°C,
- 1 ciclo de 5 minutos a 70°C.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel preparativo de agarosa 2% con buffer TAE, se purificaron tal como se describió en párrafos anteriores y las muestras se enviaron al servicio del INTA para su secuenciación. Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación y corroboradas las alineaciones con secuencias de ARNm de la proteína StAR de otras especies por medio del programa BLAST, se realizó el ensamblado de las mismas. Para ello se utilizó el programa CAP3 Sequence Assembly Program (Huang y Madan, 1999), hasta obtener una única secuencia consenso.

#### Análisis de la secuencia nucleotídica

En la secuencia nucleotídica obtenida se buscaron los marcos de lectura abiertos (ORFs) y se predijo la secuencia de aminoácidos de StAR de *R. arenarum* mediante el programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder) de la NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias aminoacídicas traducidas para cada marco de lectura se compararon contra secuencias que se encuentran en una base de datos *on line* con el programa BLAST y se eligió aquella secuencia que compartía un alto grado de identidad con la proteína StAR de especies emparentadas, descartando los marcos de lectura que producían polipéptidos pequeños. La caracterización y el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína se realizó utilizando las distintas herramientas de los programas BLAST y ExpASy (Expert Protein Analysis System) Bioinformatics Resource Portal (Artimo y col., 2012).

#### Obtención del ARNm de StAR utilizando ARN de testículo.

Dado que la proporción de células esteroideogénicas del testículo es muy baja, para obtener el ARNm de StAR a partir de los testículos de *R. arenarum* se utilizó el kit GenElute™ mRNA (Sigma-Aldrich, EE.UU) que permite aislar ARNm a partir del ARN total. La extracción y cuantificación del ARN total a partir de los testículos se realizó tal como se describió en párrafos anteriores para la extracción de ARN total de interrenales. Luego, a 500 µg de ARN total se le adicionaron 250 µl de solución de

unión 2X y 15 µl de perlas oligo(dT) en un volumen final de 250 µl. Esta preparación se incubó durante 3 minutos a 70°C y por 10 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se centrifugó por 2 minutos a 16000 xg y se descartó el sobrenadante dejando 50 µl para no perturbar el pellet. El mismo se resuspendió con 500 µl de solución de lavado y se transfirió al ensamble columna (filtro)/tubo de colección. Se realizó una centrifugación de 2 minutos a 16000 xg y se descartó lo eluido colectado en el tubo. A la columna se le agregaron 500 µl de solución de lavado y se reiteró el centrifugado. Luego, se transfirió la columna a un tubo de colección limpio y se adicionaron 50 µl de solución de elución Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Luego de una incubación de 5 minutos a 70°C se centrifugó durante 1 minuto y se realizó una segunda elución. El ARNm presente en el eluido se guardó a -80°C hasta su utilización.

Todo el procedimiento que llevó a la secuenciación y posterior procesamiento de las secuencias obtenidas se realizó como fuera descripto, incluso las PCRs con primers específicos y la Tm correspondiente (ver Resultados y Discusión).

#### Alineamiento múltiple de secuencias

Los alineamientos múltiples de las secuencias se realizaron utilizando los dos métodos que se encuentran en el programa MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura y col., 2013). Uno de éstos es el método de alineamiento progresivo Clustal Omega, muy utilizado en servidores web públicamente accesibles. El otro de los métodos es el MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, o alineamiento múltiple de secuencias por log-esperanza), clasificado como iterativo. La representación visual del alineamiento múltiple se utilizará para observar mutaciones puntuales y para evaluar la conservación de dominios proteicos.

#### Análisis filogenético

Para realizar los estudios filogenéticos, se generaron árboles filogenéticos de StAR utilizando los alineamientos múltiples de las secuencias de la proteína, mencionados en el párrafo anterior. Los árboles se construyeron por el método de máxima verosimilitud (MV) utilizando el programa MEGA 6.0. El método de MV es un método estadístico basado en modelos de evolución molecular, donde se toma en cuenta el conocimiento que *a priori* se tiene acerca de los caracteres, especialmente cuando son caracteres moleculares (Peña, 2011). Los modelos de evolución son muy importantes, ya que se necesitan para calcular las probabilidades en el método de MV. En el caso de proteínas normalmente se utilizan matrices empíricas que indican la frecuencia de las distintas sustituciones entre aminoácidos. Para este trabajo se, utilizó el modelo

Jones-Taylor-Thornton (JTT; Jones y col., 1992) considerando una tasa de cambios uniforme y una tasa de cambios con sitios invariantes (I). Para la determinación del modelo y la tasa de cambio se utilizó el programa para selección de modelos ProtTest 3.4.2 (Darriba y col., 2011). En todos los casos el test de filogenia se realizó mediante el método de "Bootstrap" con 500 iteraciones.

### Regulación de la expresión de ARNm de StAR

#### Expresión diferencial de StAR

Este ensayo se realizó con el objetivo de estudiar la especificidad tisular de expresión del mensajero de StAR. Las condiciones utilizadas tanto para la extracción y cuantificación del ARN total como para la transcripción reversa son las mismas que las detalladas para la glándula interrenal y el testículo. Los órganos utilizados fueron, además de testículo e interrenal, órgano de Bidder, cerebro, piel, riñón y corazón. Las PCRs se realizaron con el protocolo descrito en "PCR degenerada de StAR" con los primers específicos StAR-3'(b) y sus Tm correspondientes (ver Resultados y Discusión). Se eligieron estos primers del conjunto utilizado en la secuenciación de ARNm de interrenal dado que con ellos se obtenía una banda nítida y bien marcada. Para testículo también se realizó el mismo protocolo de PCR pero utilizando ADNc del ARNm total. Este último se obtuvo con el kit GenElute™ mRNA (Sigma-Aldrich, EE.UU) como se describió anteriormente. En todos los casos el control negativo se realizó en presencia de todos los componentes de la PCR excepto la muestra. En su lugar se utilizó agua DEPC. En este ensayo, y en los que se realizaron posteriormente, se necesitó un control interno. Para ello se utilizó una secuencia de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que es una enzima del metabolismo de los hidratos de carbono. Los primers de esta secuencia específicos para *R. arenarum* fueron obtenidos y utilizados en otros trabajos de nuestro laboratorio (Volonteri y col., 2013).

#### Efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre el ARNm de StAR

Como ya se mencionara en el Capítulo 2, el tratamiento con estimuladores de la esteroidogénesis de cortes de testículo no modificó la cantidad de proteína StAR con respecto a los respectivos controles. Por otra parte, el haber secuenciado el ARNm de la proteína de testículo permitió confirmar su presencia en dicho tejido. Por todo esto es que se decidió estudiar el efecto de estimuladores de la esteroidogénesis sobre la expresión del ARNm StAR. Para ello, se eligieron las concentraciones máximas de estimuladores utilizadas en los experimentos de análisis de la proteína. Estas concentraciones son 40 UI para hCG y 1mM para 8-Br-AMPc. Para los tratamientos,

los testículos fueron cortados en seis fragmentos. Dos fragmentos de cada testículo elegidos al azar fueron incubados en 4 ml de medio de cultivo L-15 con o sin los estimuladores, durante 4 horas con agitación a 28°C. Luego de las incubaciones 1 ml del medio se guardó a 20°C para la posterior determinación de andrógenos por RIA. Los fragmentos testiculares se procesaron utilizando el kit Gen Elute Direct mRNA Miniprep (Sigma-Aldrich, EE.UU). Este kit permite aislar directamente ARNm a partir de tejido. Para ello, se homogeneizaron 50 mg de tejido con 1 ml de solución de lisis que contiene SDS y proteinasa K, y el homogenato se incubó a 65°C durante 10 minutos para degradar nucleasas y otras proteínas. Terminada la incubación, se agregaron 64 µl de NaCl 5M con el objeto de facilitar la unión del ARNm poliadenilado con el oligo dT30 unido covalentemente a perlas de poliestireno. La preparación se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 5 minutos a 16000 xg para precipitar el complejo perlas-oligo(dt)-ARNm. El sobrenadante fue cuidadosamente retirado y descartado dejando aproximadamente 50 µl para evitar perturbar el precipitado. Este último se resuspendió en 0,5 ml de solución de lisis + 32 µl de NaCl 5M y se incubó a 65°C durante 5 minutos y a temperatura ambiente otros 5 minutos más. Se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 16000 xg y se descartó el sobrenadante. Estos pasos permitieron obtener una preparación enriquecida de ARNm. El precipitado obtenido se resuspendió en 350 µl de solución de lavado, dicha suspensión se transfirió al ensamble columna (filtro)/tubo de recolección y se centrifugó durante 2 minutos a 16000 xg. Una vez retirada la columna se desechó el eluido y se ensambló nuevamente la columna con el tubo de recolección. Se realizaron otros dos lavados con 350 µl de una solución de lavado baja en sales luego de lo cual la columna se transfirió a un tubo de recolección limpio y se agregaron 50 µl de solución de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), se incubó durante 5 minutos a 65°C y se centrifugó 1 minuto a 16000 xg. El eluido contiene el ARNm que se guardó a -80°C hasta su utilización. Nuevamente, la cuantificación, el tratamiento con ADNasas y la transcripción reversa se realizaron como se detalló anteriormente.

#### PCR cuantitativa en tiempo real

Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando el sistema QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR (Life Technologies, EE.UU) que consta de un equipo termociclador para PCR en tiempo real y un software adecuado para tal fin. La cuantificación se realizó utilizando experimentos comparativos de CT ( $\Delta\Delta C_T$ ). Este método de análisis de datos para PCR en tiempo real consta de una cuantificación relativa que describe el cambio en la expresión del mensajero a medir con respecto a algún grupo de referencia tal

como un control no tratado o una muestra en el tiempo cero (Livak y Schmittgen, 2001).

Los primers específicos de StAR usados en estas mediciones (ver Resultados y Discusión) se diseñaron en base a la secuencia obtenida de testículo, utilizando el programa Beacon Designer 6.0 (PREMIER, Biosoft). Como control interno se utilizó GAPDH como se describió anteriormente.

La mezcla de reacción de la PCR consistió en: 7,5 µl de ADNc en una dilución 1/6; 15 µl de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics, España) y 3,75 µl de cada primer en una concentración de 2,5 µM diluidos en un volumen final de 30 µl. Las condiciones fueron:

- 1 ciclo de 10 minutos a 95°C,
- 40 ciclos de: 20 segundos a 95°C (desnaturalización); 30 segundos a 59°C (hibridación); 20 segundos a 72°C (extensión),
- Curva de fusión,
- 1 ciclo de 60 segundos a 95°C; 30 segundos 58°C a 95°C.

## Resultados y Discusión

### Secuenciación de StAR y análisis filogenético

#### Caracterización molecular de StAR

Como parte de la caracterización de la proteína StAR de *R. arenarum* se determinó la secuencia aminoacídica de la misma. Para ello fue necesario obtener la secuencia nucleotídica de su ARNm y realizar la posterior traducción. La secuencia se obtuvo utilizando la técnica 3'-5' RACE, tal como se describió en Materiales y Métodos, para lo cual fue necesario identificar inicialmente un fragmento interno específico del mensajero a través de una PCR degenerada. El resultado así obtenido, detallado en la figura 25, se comparó y alineó con distintas secuencias que se encuentran en una base de datos *on line*, utilizando el programa BLAST. El resultado de esta primera alineación mostró un alto porcentaje de identidad con fragmentos de secuencias de distintos mensajeros de la proteína StAR de otras especies. Entonces, a partir de dicha secuencia se diseñaron cuatro primers específicos para realizar la amplificación de los extremos, denominados 3' RACE, 5' RACE, 3' nested RACE y 5' nested RACE (Tabla 1). Los primers denominados nested (anidados) RACE se utilizan para una segunda ronda de PCR, en la que se usa como molde el producto de la PCR anterior.

```

NNNNNNNNNTCTCGTACATGACGGGTCTCAGGAGAACGGCTGCAGTAGCTCTTTC
ACATGAACTGGAAAAGTTGGCTCTAGTTGGACCAGGACCCAGTCAATGGATAAATC
AAGTGAGAAGAAGAAGCTCGCTACTGAGTTCCAGACTTGATGAGAAACCCTACAAT
GAAGTTGAGATGTCTTACCTCAAGCAGGGAGAAGAAGCCCTAAAGAAGTCAATGAA
CATCCTGGAAGAACAAGATGGATGGAAAGTGGAAATTGTGGCGGAAAATGGAGAT
AAAGTTCTCAGTAAAGTCTCCCGGACATCGGAAAGGTCTTTAAGCTTGAAGCCG
TGGTGGAGAAGCCATTGGATAGTGTCTATGGAGAGCTGGTGGACAATATGGAGAA
TATGGGAGAATGGAATCCAAGTGTGAAAGAAATTAAGATTCTCCAGAAGATTGGAA
AGGACACAGTAATAACACACGAGAAGGCGGCAGAACTCCTGGGAATATTATAGG
ACCTCGGGATTTCTGTGAGTGTGAGATGCAGCAAGAGGAGAGGCTCCACCTGTATT
CTTGCCGGAATGTCAACAAGATTTANTGGAATGCCCGANCANANNGNATTTNTANN
NNATGCCNGANCAGAAGGGGATTTTGTATGCCTGANCNNNNGGGATTTGTANN

```

**Figura 25.** Fragmento interno del ARNm de StAR de *R. arenarum* obtenido mediante la secuenciación de un fragmento de ADN copia (ADNc) obtenido a partir de una PCR degenerada utilizando primers degenerados (ver Materiales y Métodos) El fragmento con fondo gris es el que se utilizó para el diseño del primer 3'RACE y el fragmento en negritas subrayado se utilizó para el 5'RACE.

| Nombre                      | Secuencia                    |
|-----------------------------|------------------------------|
| StAR-3' RACE                | GAAGCCGTGGTGGAGAAGCCATTGGATA |
| StAR-3' RACE nested         | GCCATTGGATAGTGTCTATGGAGAGCTG |
| StAR-5' RACE                | CCACCACGGCTTCAAGCTTAAAGACCTT |
| StAR-5' RACE nested         | CCGATGTCCGGGAGGACTTTACTGAGAA |
| GeneRacer™ 5' Primer        | CGACTGGAGCACGAGGACACTGA      |
| GeneRacer™ 5' Primer nested | GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA   |
| GeneRacer™ 3' Primer        | GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG    |
| GeneRacer™ 3' Primer nested | CGCTACGTAACGGCATGACAGTG      |

**Tabla 1:** Secuencias de todos los primers específicos utilizados en la secuenciación del ARNm de StAR utilizando la técnica RACE 3'-5'. Código IUB: A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timidina;

Luego de varios intentos modificando condiciones de temperatura y/o concentración de primers en las PCRs, se obtuvo un fragmento correspondiente al extremo 5' del mensajero, no así para el extremo 3'. Para este último se obtenían "chorreados" que podían deberse a que el primer GeneRacer 3' y también el GeneRacer 3' nested estuvieran uniéndose a más de un sitio del ADNc. A partir de las secuencias obtenidas con la PCR degenerada y la PCR 5' RACE se construyó una secuencia consenso parcial del ARNm de StAR. Luego de realizar la alineación de la misma con otras secuencias de ARNm de StAR de anfibios, se diseñaron nuevos primers. Aquellos con los cuales se lograron amplificar fragmentos de ADNc se detallan en Tabla 2.

| Nombre                   | Secuencia                   |
|--------------------------|-----------------------------|
| Fw StAR-5'(b) (Tm 70° C) | CGAGGACACTGAGGACACTGACATGG  |
| Rv StAR-5'(b) (Tm 70° C) | GTGAAAGAGCTACTGCAGCCGTTCTCC |
| Rv StAR-3'(a) (Tm 67°C)  | GATGTTTGGCAAATCCACTTGTGTC   |
| Fw StAR-3'(a) (Tm 66°C)  | CGGAAAGGTCTTTAAGCTTGAAGCC   |
| Rv StAR-3'(b) (Tm 59°C)  | CAAGTTTTTATTAATGGCACCAATAC  |
| Fw StAR-3'(b) (Tm 60°C)  | GGATACGTAAGGGCAGAGAATG      |

**Tabla 2:** Primers utilizados para la secuenciación del ARNm de StAR en *R. arenarum*. Se diseñaron a partir de alineaciones de la secuencia parcial obtenida con otras secuencias presentes en el GenBank de ARNm de StAR de *L. catesbeianus* (FJ428615.1), *Lithobates sylvaticus* (JX512958.1) y *G. rugosa* (AB372217.1). Tm: Temperatura de fusión.

Cada una de las secuencias parciales obtenidas utilizando los distintos primers fue buscada y alineada con otras secuencias de la base de datos *on line* utilizando el programa BLAST. Todos los fragmentos obtenidos que resultaron con un alto porcentaje de identidad con otros fragmentos de secuencias de ARNm de distintas especies (Figura 26) se ensamblaron utilizando el programa CAP3 Sequence Assembly Program, como se menciona en Materiales y Métodos, hasta obtener la secuencia codificante del ARNm de StAR. Se diseñaron otros primers a partir de la secuencia obtenida (Figura 27), alineada nuevamente con otras secuencias de ARNm de la proteína de distintas especies. Se realizaron PCRs en distintas condiciones con el objetivo de lograr la secuenciación del mensajero hasta la cola de poliadenilación. Lamentablemente, con el ARN obtenido no se obtuvieron resultados positivos. Una dificultad importante para el diseño de los primers en las secciones no codificantes de

los mensajeros es la alta variabilidad en dichas secciones entre los mensajeros de las distintas especies, aún entre las secuencias de distintos anfibios.

La secuencia resultante se analizó con el programa ORF Finder teniendo en cuenta todos los marcos de lectura posible. Se encontraron seis marcos de lectura abiertos. El análisis de alineamiento local (BLAST) de las secuencias proteicas correspondientes a los distintos ORFs reveló que cinco de ellas no mostraban identidad significativa con las secuencias presentes en la base de datos utilizada, dado que se trataba de oligopéptidos de corta longitud. La secuencia restante se alineó con secuencias de otras especies presentes en la base de datos *online* GenBank con altos porcentajes de identidad (Tabla 3). Estos porcentajes son calculados e informados por programa BLAST luego de la búsqueda y alineación de la secuencia ingresada y nos permitieron asumir que la secuencia obtenida para *R. arenarum* correspondería a la proteína StAR. Para verificar esto se continuó el análisis de la secuencia por medio de distintas herramientas.

>1ra secuencia  
 NNNNNNNNTCTCGTACATGACGGGTCTCAGGAGAACGGCTGCAGTAGCTCTTTCAC  
 ATGAACTGGAAAAGTTGGCTCTAGTTGGACCAGGACCCAGTCAATGGATAAATCAAGT  
 GAGAAGAAGAAGCTCGCTACTGAGTTCCAGACTTGATGAGAAACCCTACAATGAAGTT  
 GAGATGTCTTACCTCAAGCAGGGAGAAGAAGCCCTAAAGAAGTCAATGAACATCCTGG  
 AAGAACAAGATGGATGGAAAAGTGGAAATTGTGGCGGAAAATGGAGATAAAGTTCTCAG  
 TAAAGTCTCTCCCGGACATCGGAAAGGTCTTTAAGCTTGAAGCCGTGGTGGAGAAGCC  
 ATTGGATAGTGTCTATGGAGAGCTGGTGGACAATATGGAGAATATGGGAGAATGGAAT  
 CCAACTGTGAAAGAAATTAAGATTCTCCAGAAGATTGGAAAGGACACAGTAATAACAC  
 ACGAGAAGGCGGCAGAACTCCTGGGAATATTATAGGACCTCGGGATTTCTGTGAGTG  
 TGAGATGCAGCAAGAGGAGAGGCTCCACCTGTATTCTTGCCGGAATGTCAACAAGATT  
 TANTGGAATGCCCGANCANANNGNATTTNTANNNNATGCCNGANCAGAAGGGGATTTT  
 GTATGCCTGANCNNNNGGGATTTGTAN

>2da secuencia  
 ANNNNANANATANNNNNAGNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNANNNNNNNNNNN  
 NNNNNNNNNNNCNCNNNNNNANNNNNNNNNANANNNNNNNNNNTNNNNNNNTTNNNCN  
 CCNCANGNGTATATCAAGCTTACAAAACCTCATCTGCTACAGACTCCAGAGAATAGAG  
 AGTAATTTCCCCTAGAGAGACCGGCAACCTAATTCTTCTGTGAGCTATGTTGCCTGCC  
 ACCTTCAAACCTCTGTGCTGGGATATCATACAGACATCTTCGTAACATGACGGGTCTCA  
 GGAGAACGGCTGCAGTAGCTCTTTCACATGAACTGGAAAAGTTGGCTCTAGTTGGACC  
 AGGACCCAGTCAATGGATAAATCAAGTGAGAAGAAGAAGCTCGCTACTGAGTTCCAGA  
 CTTGATGAGAAACCCTACAATGAAGTTGAGATGTCTTACCTCAAGCAGGGAGAAGAAG  
 CCCTAAAGAAGTCAATGAACATCCTGGAAGAACAAGATGGATGGAAAGTGGAAATTGT  
 GGCGGAAAATGGAGATAAAGTTCTCAGTAAATCTCCNNNNN

>3ra secuencia  
 NNNNNTCGANGACNNNGANGACNNTGACATGGANNGNAGGANNANAANAGTACATAG  
 ATATACACAGAGCAAAGACTCCAGTCTACNTTCATAGCTGGCAATACAGAGGACCTGA  
 CCACCCATAGACTTCCAACAGAAGTGGACTTTGGGAATTTTGACCACCAACTGACTAT  
 CAAGCTTAGAAAACCTCATCTGCTACAGACTCCAGAGAATAGAGAGTAATTTCCCCTA  
 GAGAGACCGGCAACCTAATTCTTCTGTGAGCTATGTTGCCTGCCACCTTCAAACCTCTG  
 TGCTGGGATATCATACAGACATCTTCGTAACATGACGGGTCTCNGAGANNNGNTGC  
 NNTNNNTNTT

>4ta secuencia  
 TCGGAAAGGTCTTTAAGCTTGAAGCCGTGGTGGAGAAGCCATTGGATAGTGTCTATGG  
 AGAGCTGGTGGACAATATGGAGAATATGGGAGAATGGAATCCAACGTGAAAGAAATT  
 AAGATTCTCCAGAAGATTGGAAAGGACACAGTAATAACACACGAGAAGGCGGCAGAA  
 ACTCCTGGGAATATTATAGGACCTCGGGATTTCTGTGAGTGTGAGATGCAGCAAGAGG  
 AGAGGCTCCACCTGTATTCTTGCCGGAATGTCAACAAGATTAGTGGAATGCCGGAAC  
 AGAAAGGATACGTAAGGGCAGAGAATGGTCCAACATGTATGGTACTTCACCCAGTACT  
 TGAAGACCCCTCAAAAACCAAACTAACCTGGCTTCTTAGCATTGACTTAAAGGGCTGG  
 CTGCCAAAGTCTATCATAAACCAANNTTNNNN

>5ta secuencia  
 NNNNTGANTACGTNAAGGGCAGAGAATGGTCCAACATGTATGGTACTTCACCCAGTAC  
 TTGAAGACCCCTCAAAAACCAAACTAACCTGGCTTCTTAGCATTGACTTAAAGGGCTG  
 GCTGCCAAAGTCTATCATAAACCAAGTGTTGTCCAGACGCAAGTGGATTTTGCTAAA  
 CATCTACGTAACAGGGTCGCTATGTCCACTGCCAGCCTGTCACTCTGCTAACCGTTCA  
 CCCTCATCATCATCACACCCTTCCTGGTGATCCTTTTGACAACACCACAAGGCCAAGC  
 CAGGTTGTTGCAGAGACCCGTAAACGAAAGGGTCTTAAAGAGGGTGTTCCAGCCTTG  
 GATAACTACCTTGACAAGCTGTGAGCTCTGTTTCATGTGTTCTGAATCATCTGATGGACT  
 TGACAACTTTAACTAGATTTTCTATGGCCCATCAACAAGGTACAATTTAAATAGCCTG  
 TAAGTGGGAGTATAGAGTATGCTTGAATCATTAAGAACACCACTGTCTTCACAGCATG  
 AAATATCAGCCAATGTATNNGTGNCCATAAATTAAAAACTTTGANNNNN

**Figura 26** Secuencias parciales del ARNm de StAR de *R. arenarum* obtenidas mediante la secuenciación de fragmentos de ADN copia (ADNc) resultantes de PCRs realizadas con los primers detallados en la Tabla 2 (secuencias 3ra a 5ta). La primera secuencia corresponde al resultado de la PCR degenerada (Figura 25) y la segunda secuencia es el resultado de la RACE 5'.

| Espece                              | N° GenBank      | Clase/Orden                     | % Id |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------|------|
| <i>Potamotrygon hystrix</i>         | AAS64370        | Chondrichthyes/Myliobatiformes  | 62   |
| <i>Latimeria chalumnae</i>          | XP006000418     | Sarcopterygii/Coelacanthimorpha | 78   |
| <i>Acipenser trasmontanus</i>       | ACI23577        | Actinopterygii/Acipenseriformes | 77   |
| <i>Anguilla australis</i>           | AGC29941        | Actinopterygii/Anguilliformes   | 76   |
| <i>Anguilla japonica</i>            | BAC66210        | Actinopterygii/Anguilliformes   | 76   |
| <i>Cyprinus carpio</i>              | ACD37725        | Actinopterygii/Cypriniformes    | 72   |
| <i>Danio rerio</i>                  | NP571738        | Actinopterygii/Cypriniformes    | 69   |
| <i>Micropogonia undulatus</i>       | ABG34343        | Actinopterygii/Perciformes      | 71   |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>          | NP001117674     | Actinopterygii/Salmoniformes    | 70   |
| <i>Gadus morhua</i>                 | AAP44112        | Actinopterygii/Gadiformes       | 68   |
| <i>Sparus aurata</i>                | ABV25959        | Actinopterygii/Perciforme       | 73   |
| <i>Oreochromis niloticus</i>        | XP003445653     | Actinopterygii/Perciforme       | 75   |
| <i>Xenopus laevis</i>               | NP001167502     | Amphibia/Anura                  | 87   |
| <i>Silurana tropicalis</i>          | XP002932770     | Amphibia/Anura                  | 88   |
| <b><i>Rhinella arenarum</i></b>     | <b>AMD33476</b> | Amphibia/Anura                  | 100  |
| <i>Nanorana parkeri</i>             | XP018422163     | Amphibia/Anura                  | 92   |
| <i>Lithobates catesbeianus</i>      | ACJ53927        | Amphibia/Anura                  | 91   |
| <i>Glandirana rugosa</i>            | BAH09112        | Amphibia/Anura                  | 91   |
| <i>Pogona vitticeps</i>             | XP020641819     | Sauropsida/Squamata             | 75   |
| <i>Crocodylus porosus</i>           | XP019401652     | Sauropsida/Crocodylia           | 78   |
| <i>Gallus gallus</i>                | NP990017        | Aves/Galliformes                | 77   |
| <i>Taeniopygia guttata</i>          | NP001070154     | Aves/Passeriformes              | 77   |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> | OPJ83898        | Aves/Columbiformes              | 77   |
| <i>Amazona aestiva</i>              | KQK82357        | Aves/Psittaciformes             | 75   |
| <i>Homo sapiens</i>                 | NP000340        | Mammalia/Primates               | 70   |
| <i>Macaca mulata</i>                | EHH28420        | Mammalia/Primates               | 69   |
| <i>Mus musculus</i>                 | NP035615        | Mammalia/Rodentia               | 66   |
| <i>Rattus norvegicus</i>            | NP113746        | Mammalia/Rodentia               | 66   |
| <i>Canis lupus familiaris</i>       | NP001091011     | Mammalia/Carnívora              | 68   |
| <i>Sus scrofa</i>                   | NP998929        | Mammalia/Artiodactyla           | 67   |
| <i>Bos taurus</i>                   | NP776614        | Mammalia/Artiodactyla           | 65   |
| <i>Ovis aries</i>                   | NP001009243     | Mammalia/Artiodactyla           | 64   |

**Tabla 3.** Nombre científico, clase y orden de las especies utilizadas para el análisis filogenético. En las otras dos columnas se detallan el número de acceso a la base de datos *online* GenBank y el porcentaje de identidad (%Id) de la secuencia de *R.arenarum* con el resto de las secuencias, obtenido con el programa BLAST. Entre los peces se utilizaron: una especie de pez cartilaginoso, once especies de peces óseos de las cuales una pertenece a la clase Sarcopterygii (peces con aletas lobuladas) y el resto a la clase Actinopterygii (peces con aletas radiadas). Los anfibios encontrados pertenecen únicamente del orden Anura.

### Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica.

El ADNc obtenido a partir del ARNm de interrenal de sapo tiene 1350 pb y posee una región 5' no codificante de 176 pb y una región 3' no codificante de 316 pb (Figura 27). La región 3' no codificante no incluye la cola de poliadenilación del ARNm. El fragmento codificante se corresponde con una proteína de 285 aminoácidos. El análisis por métodos computacionales de la secuencia aminoacídica obtenida muestra distintas características de la proteína que nos permiten asociar nuestra secuencia a la proteína StAR. Entre estas, se identificaron dos secuencias consenso para la fosforilación catalizada por la PKA, una serina/treonina quinasa, sombreadas en gris en la figura 27. La primera de las secuencias estaría entre las posiciones 53-56 o 54-57, dado que la secuencia consenso para la fosforilación por la quinasa es R-R-X-S/T. La segunda secuencia se encuentra entre los aminoácidos 192-195. Ambas secuencias consenso, en posiciones similares, fueron descritas para StAR de algunos mamíferos, como se muestra más adelante (Arakane y col., 1997). La identificación de los sitios se logró utilizando la herramienta computacional NetPhos 3.1 que permite predecir sitios de fosforilación de 17 quinasas (Blom y col., 2014). En este programa, aquellos sitios serina (S) o treonina (T) ubicados en una determinada secuencia y con una alta probabilidad de fosforilación tienen un puntaje asignado cercano a uno. El aminoácido serina en la posición 56 (S-56) tiene un puntaje de 0,84, el S-57 de 0,86 y el S-195 de 0,9 para la fosforilación por PKA, siendo este último el puntaje mayor de todos los sitios y quinasas predichos.

Por otra parte, utilizando la base de datos de dominios conservados del NCBI (Marchler-Bauer y col., 2015), también se encontró que en el extremo C-terminal de la secuencia analizada está presente el dominio START\_STARD1-like, cuyo registro en dicha base de datos es cd08905. Este dominio pertenece a la superfamilia de proteínas SRPBCC que une ligandos hidrofóbicos como el colesterol, por ejemplo (Ponting y Aravind, 1999).

Como se detalló en la Introducción, una característica diferencial de la proteína StAR, dentro de las familias de proteínas con dominio START de mamíferos, es la presencia de la secuencia correspondiente al péptido de direccionamiento mitocondrial (Clark, 2012). El portal de recursos bioinformáticos ExPASy contiene diversos programas que permiten caracterizar péptidos. Mediante el programa MitoProt II – v1.10 (Claros y Vincens, 1996), que permite predecir qué proteínas son exportadas a la mitocondria, se determinó con una probabilidad de 0,9627 que el péptido analizado contiene en el extremo N-terminal el dominio de direccionamiento mitocondrial.

Otro de los datos utilizados para la caracterización del péptido obtenido es el peso molecular. Para obtenerlo se utilizó el programa ProtParam (Gasteiger y col., 2005) que predijo un peso molecular de 31815,98 g/mol (31,82 kDa) para el péptido completo. Este peso molecular es muy cercano al detallado en el trabajo dónde se realiza por primera vez la caracterización de StAR. En dicho trabajo se describe un fragmento de lectura abierto de 852 pb el cual codifica para una proteína de 284 aminoácidos con una masa molecular calculada de 31,6 kD (Clark y col., 1994).

El análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica permitió relacionarlas con las secuencias correspondientes a la proteína StAR de otras especies detalladas en la tabla 3. Las secuencias se registraron en el GenBank bajo los números de acceso KT 719384, para el ARNm y AMD 33476 para la proteína.. La figura 27 muestra las secuencias tanto del ARNm como de la proteína de *R. arenarum*.

|                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| 5'-ttcatagctggcaatacagaggacctgaccaccca                         |     |
| tagacttccaacagaagtggacttttgggaattttgaccaccaactgactatcaagcttac  |     |
| aaaacctcatctgctacagactccagagaatagagagtaattttcccttagagagaccggc  |     |
| aacctaatcttctgtgagctatgttgctgccaccttcaaactctgtgctgggatatca     |     |
| M L P A T F K L C A G I S                                      | 13  |
| tacagacatcttcgtaacatgacgggtctcaggagaacggctgcagtagctctttcacat   |     |
| Y R H L R N M T G L R R T A A V A L S H                        | 33  |
| gaactggaaaagttggctctagttggaccaggaccagtcgaatggataaatcaagtgaga   |     |
| E L E K L A L V G P G P S Q W I N Q V R                        | 53  |
| agaagaagctcgctactgagttccagacttgatgagaaaccctacaatgaagttgagatg   |     |
| R R S S L L S S R L D E K P Y N E V E M                        | 73  |
| tcttacctcaagcagggaagaagccctaaagaagtcaatgaacatcctggaagaacaa     |     |
| S Y L K Q G E E A L K K S M N I L E E Q                        | 93  |
| gatggatggaaaagtggaaattgtggcggaaaatggagataaagttctcagtaaagtcctc  |     |
| D G W K V E I V A E N G D K V L S K V L                        | 113 |
| ccggacatcggaaaaggtctttaagcttgaagccgtggtggagaagccattggatagtgct  |     |
| P D I G K V F K L E A V V E K P L D S V                        | 133 |
| tatggagagctggtggacaatatggagaatatgggagaatggaatccaactgtgaaagaa   |     |
| Y G E L V D N M E N M G E W N P T V K E                        | 153 |
| attaagattctccagaagattggaaaggacacagtaataacacacgagaaggcggcagaa   |     |
| I K I L Q K I G K D T V I T H E K A A E                        | 173 |
| actcctgggaatattataggacctcgggatttctgtgagtgatgcagcaagaggaga      |     |
| T P G N I I G P R D F V S V R C S K R R                        | 193 |
| ggctccacctgtattcttgccggaatgtcaacaagatttagtggaatgccggaacagaaa   |     |
| G S T C I L A G M S T R F S G M P E Q K                        | 213 |
| ggatacgtaaaggcagagaatgggtccaacatgtatggtacttcacccagtagcttgaagac |     |
| G Y V R A E N G P T C M V L H P V L E D                        | 233 |
| ccctcaaaaaccaaactaacctggcttcttagcattgacttaaagggtggtgctgcaaag   |     |
| P S K T K L T W L L S I D L K G W L P K                        | 253 |
| tctatcataaaccaagtgttgtccagacgcaagtggattttgctaaacatctacgtaac    |     |
| S I I N Q V L S Q T Q V D F A K H L R N                        | 273 |
| agggtcgctatgtccactgccagcctgtcactctgctaaaccgttcaccctcatcatcatc  |     |
| R V A M S T A S L S L C -                                      | 285 |
| acacccttcttggtgatccttttgacaacaccacaaggccaagccaggttgttgagaga    |     |
| cccgtaaacgaaagggtcttaagagggtgttccagccttgataactaccttgacaagc     |     |
| tgtgagctctgttcatgtgttctgaatcatctgatggacttgacaactttaactagat     |     |
| tctatggcccatcacaagggtacaatttaaaatagcctgtaagtgggagtagatagatg    |     |
| cttgaatcattaagaacaccactgtcctcacagcatgaaatatcagccaatgtat-3'     |     |

**Figura 27:** Secuencia nucleotídica (en letra minúscula) y aminoacídica (en letra mayúscula) de la proteína STAR de *R. arenarum*. Los números a la derecha de la secuencia representan la cantidad de aminoácidos. En la secuencia nucleotídica se marcan subrayados el codón de iniciación de la transcripción y el codón STOP. Los primeros 26 aminoácidos en el extremo N-terminal corresponden al péptido señal mitocondrial. En gris se resaltan las secuencias consenso para la fosforilación por PKA

Verificación de secuencia del ARNm de StAR utilizando ARN de testículo.

Una vez obtenida y analizada la secuencia del ARNm utilizando el ARN total obtenido de la glándula interrenal se diseñaron nuevos primers específicos para el mensajero de StAR con la intención de obtener distintos fragmentos utilizando ARN del testículo. Se probaron distintos primers utilizando al ARN total del testículo sin resultados relevantes. Se plantearon entonces dos posibilidades: 1) que la baja proporción de células esteroideogénicas en el testículo hiciera difícil obtener la cantidad de ARNm necesaria para la determinación; 2) que las células esteroideogénicas del testículo no expresaran StAR pero si alguna otra proteína de transporte de colesterol, como la proteína descrita en la placenta humana, la MLN64 (Tuckey, 2005).

Con el objeto de comprobar la primera posibilidad se utilizó un método que permitiera aislar el ARNm total en lugar del ARN total, tal como se describe en Materiales y Métodos. El ARNm total obtenido fue cuantificado y retrotranscrito a ADNc a partir de la técnica RT-PCR. Con ese ADNc se realizaron distintas PCRs utilizando los primers, detallados en la Tabla 4, que fueron diseñados sobre la secuencia del ARNm de StAR obtenida de interrenal de *R. arenarum*. Luego de la purificación del producto de cada PCR y la secuenciación de todos ellos se obtuvieron las secuencias que se detallan en la Figura 28. Estos fragmentos se buscaron, analizaron y procesaron de la misma forma utilizada para los resultados de la secuenciación obtenidos a partir de la glándula interrenal de *R. arenarum*.

| Nombre     | Secuencia               |
|------------|-------------------------|
| StARFwPCR1 | TGCTACAGACTCCAGAGAATAGA |
| StARRvPCR1 | TCTCCCTGCTTGAGGTAAGA    |
| StARFwPCR2 | GGGAGAAGAAGCCCTAAAGAAG  |
| StARRvPCR2 | GATGATGAGGGTGAACGGTTAG  |
| StARFwPCR3 | CAGGACCCAGTCAATGGATAAA  |
| StARRvPCR3 | CCGCCTTCTCGTGTGTTATTA   |

**Tabla 4:** Secuencias de todos los primers específicos utilizados en la secuenciación del ARNm de StAR a partir de ARNm total testículo de *R. arenarum*. Código IUB: **A:** Adenina; **C:** Citosina; **G:** Guanina; **T:** Timidina.

>secuencia 1 testículo

TGCTACAGACTCCAGAGAATAGAGAGTAATTTCCCCTAGAGAGACCGGCAACCT  
AATTCTTCTGTGAGCTATGTTGCCTGCCACCTTCAAACCTCTGTGCTGGGATATC  
ATACAGACATCTTCGTAACATGACGGGTCTCAGGAGAACGGCTGCAGTAGCTC  
TTTCACATGAACTGGAAAAGTTGGCTCTAGTTGGACCAGGACCCAGTCAATGGA  
TAAATCAAGTGAGAAGAAGAAGCTCGCTACTGAGTTCCAGACTTGATGAGAAAC  
CCTACAATGAAGTTGAGATGTCTTACCTCAAGCAGGGAGAANA

>secuencia 2 testículo

CCCTAAAGAAGTCAATGAACATCCTGGAAGAACAAGATGGATGGAAAGTGGAAA  
TTGTGGCGGAAAATGGAGATAAAGTTCTCAGTAAAGTCCTCCCGGACATCGGAA  
AGGTCTTTAAGCTTGAAGCCGTGGTGGAGAAGCCATTGGATAGTGTCTATGGA  
GAGCTGGTGGACAATATGGAGAATATGGGAGAATGGAATCCAACGTGAAAGA  
AATTAAGATTCTCCAGAAGATTGGAAGGACACAGTAATAACACACGAGAAGGC  
GGCAGAAACTCCCGGGAATATTATAGGACCTCGGGATTTCGTGAGTGTGAGAT  
GCAGCAAGAGGAGAGGCTCCACCTGTATTCTTGCCGGAATGTCAACAAGATTTA  
GTGGAATGCCGGAACAGAAAGGATACGTAAGGGCAGAGAATGGTCCAACATGT  
ATGGTACTTCACCCAGTACTTGAAGACCCCTCAAAAACCAAACCTAACCTGGCTT  
CTTAGCATTGACTTAAAGGGCTGGCTGCCAAAGTCTATCATAAACCAAGTGTTG  
TCCCAGACGCAAGTGGATTTTGCTAAACATCTACGTAACAGGGTCGCTATGTCC  
ACTGNNNNNCTGTCACTCTGC

>secuencia 3 testículo

GACCCANTCAATGGATAAATCAAGTGAGAAGAAGAAGCTCGCTACTGAGTTCC  
AGACTTGATGAGAAACCCTACAATGAAGTTGAGATGTCTTACCTCAAGCAGGGA  
GAAGAAGCCCTAAAGAAGTCAATGAACATCCTGGAAGAACAAGATGGATGGAA  
AGTGGAAATTGTGGCGGAAAATGGAGATAAAGTTCTCAGTAAAGTCCTCCCGGA  
CATCGGAAAGGTCTTTAAGCTTGAAGCCGTGGTGGAGAAGCCATTGGATAGTG  
TCTATGGAGAGCTGGTGGACAATATGGAGAATATGGGAGAATGGAATCCAAC  
GTGAAAGAAATTAANATTCTCCANAANATNG....

**Figura 28:** Secuencias parciales del ARNm de StAR de *R. arenarum* obtenidas mediante la secuenciación de fragmentos de ADN copia (ADNc) resultantes de PCRs realizadas con los primers detallados en la Tabla 4.

Luego del ensamblado de las secuencias parciales utilizando el programa CAP3 Sequence Assembly, la secuencia resultante coincidió en un 100% con la secuencia obtenida a partir del tejido interrenal (datos no mostrados). Esto nos permitió aceptar lo que se planteó sobre la posibilidad de que la baja proporción de células esteroideogénicas en el testículo hiciera difícil obtener la cantidad de ARNm necesaria para la determinación. También nos permitió ajustar las técnicas de trabajo para realizar las determinaciones posteriores.

Comparación de la secuencia aminoacídica de *R. arenarum* con secuencias de otros vertebrados.

Con los objetivos de evaluar si la secuencia de la proteína StAR es adecuada para la realización de reconstrucciones filogenéticas, y de conocer el grado de divergencia que ha sufrido la proteína a lo largo de la evolución, se comparó la estructura primaria obtenida para *R. arenarum* con la de la proteína StAR de distintas especies. Para ello, se trató de abarcar la mayor cantidad de grupos, dentro de lo posible, teniendo en cuenta la existencia de las secuencias en la base de datos utilizada. Las especies seleccionadas y el número de acceso a la secuencia en la base de datos GenBank se detallaron en la tabla 3. Para los peces cartilaginosos se encontró sólo una especie mientras que para los peces óseos se seleccionaron once especies de actinopterigios y la única especie encontrada de sarcopterigios. Para anfibios se utilizaron todas las especies presentes en la base de datos, cinco especies en total, todas correspondientes al orden Anura. No se incluyó en el análisis a *L. sylvaticus* debido a que su secuencia está incompleta. También, se utilizaron especies de aves (3), reptiles (2) y mamíferos (6). Las especies cuyo número de acceso a la base de datos comienzan con XP corresponden a secuencias de StAR que fueron deducidas computacionalmente de sus genomas enteramente secuenciados.

Para realizar la comparación de todas las secuencias fue necesario hacer un alineamiento global multisequencial. Este alineamiento se realizó con dos programas desarrollados para dicho propósito, el Clustal Omega y el MUSCLE. Ambos forman parte de las herramientas del programa MEGA 6.0 que se utilizó para el análisis filogenético.

La mayoría de los algoritmos de alineamiento pueden aplicarse tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de nucleótidos. Sin embargo, las proteínas están más conservadas que los ARNm dado que en muchos casos cambios de un solo nucleótido en un codón no modifican el aminoácido resultante. Por esto, en esta tesis se utilizaron las secuencias aminoacídicas para todos los análisis.

En la figura 29 se detalla el resultado del alineamiento realizado con el programa Clustal Omega de las 32 secuencias aminoacídicas de la proteína StAR mencionadas en la tabla 3. La primera de las secuencias de la figura 29 corresponde a *R. arenarum* y para el resto de las especies solamente se indican los aminoácidos que difieren de dicha secuencia. Los números a la derecha corresponden a la cantidad parcial de aminoácidos de cada secuencia y, en la última hoja, se tiene el número total de aminoácidos de la secuencia correspondiente a cada especie. Los guiones (-) indican deleciones, "ausencia de aminoácido" o gaps que el algoritmo del programa utilizado para la alineación agregó al realizar la misma. Se muestra sólo el alineamiento realizado con el programa Clustal Omega debido a que aporta mayor cantidad de datos que la alineación realizada con el programa MUSCLE en cuanto a la cantidad de aminoácidos conservados o sustituidos de manera conservativa o semiconservativa. En las alineaciones realizadas con ambos programas se observó que 87 aminoácidos están conservados, indicados en la figura 29 con un asteriscos (\*). Con el programa Clustal Omega también se obtuvo que 72 aminoácidos se sustituyeron con otros cuyos residuos tienen propiedades químicas similares, denominadas sustituciones conservativas e indicadas en la figura con dos puntos (:) y 25 son sustituciones semiconservativas, indicadas con un punto (.). La alineación obtenida con MUSCLE no proporcionó esta última información pero se deduce del análisis de similitud realizado más adelante que los números de sustituciones conservativas y semiconservativas varían levemente. Dichas variaciones se deben a los distintos números y posiciones de gaps que insertan los programas. Sin embargo, esto sí afecta el análisis filogenético y se discutirá oportunamente.

|                                                  | 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 12 |   |   |   |   | 17 |   |   |   |   | 21 |   |   |   |   | 25 |   |    |    |  | 26 |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|----|----|--|----|
|                                                  | M | L | P | A | T | F | K | L | C | A | G | I  | S | Y | R | H | L  | R | N | M | T | G  | L | R | R | T | A  | A | 28 |    |  |    |
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | .  | 28 |  |    |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | . | I | . | . | . | . | . | . | . | A | . | .  | . | . | Q | . | V  | . | T | I | . | .  | . | . | . | H | S  | . | M  | 28 |  |    |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | Q | K | . | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | A  | . | . | . | . | .  | . | . | K | . | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | A  | . | . | . | . | .  | . | . | K | . | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | T  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | T  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | L | 28 |    |  |    |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | T | 28 |    |  |    |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | . | .  | . | . | K | N | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | H | . | . | . | .  | . | K | . | K | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | K | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | .  | . | . | Q | . | .  | . | . | V | . | .  | . | . | . | Q | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | . | . | . | . | . | S | . | . | . | A | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | Q | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | V | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | . | .  | . | . | . | Q | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | .  | . | . | Q | . | .  | . | . | . | R | .  | . | . | . | Q | .  | . | 28 |    |  |    |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | K | .  | . | . | Q | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | . | . | L | V | . | . | . | . | P | . | S | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | K | .  | . | . | Q | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | . | F | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | K | .  | . | . | H | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | . | F | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | M  | . | . | . | K | .  | . | . | H | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | V  | . | . | . | K | .  | . | . | H | Q | .  | M | 28 |    |  |    |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | V  | . | . | . | K | .  | . | . | H | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | V  | . | S | . | K | .  | . | . | Q | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | S | .  | . | . | . | . | V  | . | S | . | K | .  | . | Q | Q | Q | .  | V | 28 |    |  |    |
|                                                  | * | . | . | . | * | * | * | * | * | . | . | *  | * | . | * | . | .  | . | . | . | . | *  | * | . | . | . | .  | * |    |    |  |    |

|                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | V | A | L | S | H | E | L | E | K | L | A | L | V | G | P | G | P | S | Q | W | I | N | Q | V | R | R | R | S | 56 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | K | . | . | . | . | I | . | . | K | . | 56 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | K | . | 56 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | A | . | . | G | . | K | . | N | H | . | K | . | G | N | Q | . | . | . | . | T | . | V | D | L | . | . | . | . | 56 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | . | . | I | N | . | . | . | K | — | — | R | F | A | . | . | . | . | . | N | . | . | S | . | . | . | . | K | . | 54 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | . | . | I | N | . | . | . | S | — | — | R | . | S | . | . | . | . | . | G | . | . | S | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | . | . | I | N | . | . | . | S | — | — | R | . | S | . | . | . | . | . | G | . | . | S | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | I | . | I | H | . | . | . | N | — | — | K | . | S | . | . | . | . | A | . | T | . | . | H | I | . | . | . | . | 54 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | . | . | I | H | . | . | . | N | — | — | K | . | S | . | . | . | . | . | A | . | . | . | H | I | . | . | . | . | 54 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | . | . | I | H | . | . | . | N | — | — | R | . | A | . | . | . | . | S | . | N | . | S | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | . | . | I | H | . | . | . | N | — | — | M | . | A | . | . | . | . | N | . | S | . | S | H | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | A | . | I | H | . | . | . | N | — | — | R | R | A | . | . | . | . | S | G | N | . | . | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | . | . | I | H | . | . | . | N | — | — | R | . | A | . | . | . | . | S | . | N | . | S | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | . | . | I | A | Q | . | . | K | — | — | K | I | A | . | . | . | . | . | N | . | S | . | . | . | C | . | . | . | 54 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | . | . | I | H | . | . | . | N | — | — | T | . | A | . | . | . | . | . | N | . | S | . | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | . | T | I | V | Q | . | . | N | . | F | V | R | — | — | . | . | . | G | K | . | . | H | . | . | . | . | . | . | 54 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | . | . | I | . | Q | . | . | N | . | . | . | F | A | . | T | . | . | G | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | . | . | I | . | Q | . | . | S | . | . | S | C | R | S | T | . | . | . | T | . | . | S | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | . | . | I | . | Q | . | . | S | R | . | . | S | H | S | . | . | . | . | T | . | . | H | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | . | . | I | . | Q | . | . | S | R | . | . | R | H | . | A | . | . | G | A | . | . | H | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | L | T | I | G | Q | . | . | S | . | . | V | C | R | S | . | . | . | G | P | . | . | S | H | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | M | . | I | . | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | T | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | M | . | I | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | N | . | . | T | . | . | S | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | L | . | I | G | Q | . | . | N | W | R | . | . | G | D | S | S | . | G | — | . | M | G | . | . | . | . | . | . | 55 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | L | . | I | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | D | S | . | . | G | — | . | M | G | . | . | . | . | . | . | 55 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | L | . | I | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | T | . | G | A | . | . | . | . | Q | . | . | . | . | 56 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | L | . | . | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | T | S | G | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 56 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | L | . | I | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | A | . | A | A | . | . | Y | . | . | . | . | G | . | 56 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | L | . | I | G | Q | . | . | N | R | R | . | . | G | . | . | A | . | A | A | . | . | . | . | . | . | G | . | . | 56 |
|                                                  | : | : | : | : | : | : | : | * | . | . | . | . | . | . | . | . | . | * | : | : | : | : | : | : | * | : | : | : | .  |

57

|                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | S | L | L | S | S | R | L | D | E | - | K | P | Y | N | E | V | E | M | S | Y | L | K | Q | G | E | E | A | L | 83 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | I | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | T | L | . | D | . | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | V | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | T | L | . | G | . | . | A | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | V | F | . | A | . | . | I | . | I | . | . | . | . | Q | . | . | . | 83 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | V | F | . | A | . | . | I | . | I | . | . | . | . | Q | . | . | . | 83 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | . | . | . | . | . | . | . | . | . | - | . | V | . | S | . | I | . | T | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | . | . | I | . | . | . | K | E | D | - | S | . | . | S | . | A | . | . | A | . | V | . | . | . | Q | . | . | . | 83 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 81 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | . | . | . | . | . | . | I | E | . | - | . | A | F | S | . | T | D | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 81 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | . | . | . | . | . | . | I | E | . | - | . | A | F | S | . | T | D | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 81 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | . | . | . | . | . | P | I | A | . | - | E | T | . | S | . | A | D | Q | C | . | V | Q | . | . | Q | . | . | . | 81 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | . | . | . | . | . | . | I | A | . | - | E | T | . | S | . | A | . | Q | C | . | V | Q | . | . | Q | Q | . | . | 81 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | . | F | . | G | A | . | I | E | . | E | Q | G | . | S | . | Q | . | . | . | . | V | . | . | . | . | D | . | . | 82 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | . | . | . | . | . | . | I | E | . | E | Q | G | . | . | . | A | . | V | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | 82 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | . | F | . | . | . | . | I | E | . | A | E | E | . | S | P | E | . | V | T | . | V | R | . | . | . | S | . | . | 82 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | . | . | . | . | . | . | I | R | . | V | E | G | . | S | . | A | . | . | . | . | V | . | . | . | . | D | . | . | 82 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | . | . | . | . | . | . | I | E | . | - | . | . | . | S | . | A | . | L | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | 81 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | . | . | . | . | Q | I | . | E | . | - | E | G | . | . | . | E | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | . | 81 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | N | L | F | S | . | M | . | . | A | . | I | R | . | . | . | . | . | . | 81 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | R | . | F | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | . | F | S | . | M | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | . | F | S | . | M | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | . | . | G | . | . | . | . | E | . | - | S | . | F | S | . | M | . | . | . | . | I | R | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | . | . | . | . | . | . | . | E | . | - | . | . | F | S | . | M | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | 83 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | . | . | G | . | . | . | . | E | . | - | T | L | . | S | D | Q | . | L | A | . | Q | . | . | . | . | . | . | M | 83 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | . | . | G | . | . | . | . | E | . | - | T | L | . | S | D | Q | . | L | A | . | Q | . | . | . | . | . | . | M | 83 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | . | . | G | . | Q | . | . | E | A | - | T | L | . | S | D | Q | . | L | . | . | I | Q | . | . | . | V | . | M | 82 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | . | . | G | . | Q | . | . | E | A | - | T | L | . | S | D | Q | . | L | . | . | I | Q | . | . | . | . | . | M | 82 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | . | . | G | . | . | . | . | E | . | - | T | L | . | S | D | Q | . | L | A | . | I | R | . | . | . | . | . | M | 83 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | . | . | G | . | Q | . | . | E | D | - | T | L | . | S | D | Q | D | L | A | . | I | Q | . | . | . | . | . | M | 83 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | . | . | G | . | Q | . | . | E | D | - | S | L | . | S | D | Q | . | L | A | . | I | Q | . | . | . | . | . | M | 83 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | . | . | G | . | Q | . | . | E | D | - | P | L | . | S | D | Q | . | L | A | H | I | Q | . | . | . | . | . | M | 83 |

|                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | K | K | S | M | N | I | L | E | E | Q | D | G | W | K | V | E | I | V | A | E | N | G | D | K | V | L | S | K | 111 |     |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | . | . | . | L | . | . | . | G | D | . | . | . | . | . | T | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 111 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | . | . | . | . | . | . | . | G | D | . | . | . | . | . | T | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 111 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | . | . | . | . | S | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 111 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | . | . | . | . | S | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 111 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | . | . | . | . | S | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 111 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | H | . | . | L | S | . | . | Q | D | T | S | . | . | . | T | . | M | E | . | I | . | . | . | . | . | . | V | . | 111 |     |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | Q | . | . | I | S | . | . | S | D | . | N | . | . | . | T | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | Q | . | . | I | S | . | . | S | D | . | . | . | . | Q | T | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | Q | . | . | I | S | . | . | S | D | . | . | . | . | Q | T | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | Q | . | . | I | S | . | . | . | D | . | . | . | . | Q | T | . | . | E | S | I | . | E | . | . | M | . | . | . | 109 |     |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | Q | . | . | I | S | . | . | S | D | . | . | . | . | Q | T | . | . | E | S | A | . | . | . | . | M | . | . | . | 109 |     |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | Q | . | A | I | S | . | . | S | . | . | . | . | . | T | L | . | T | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | Q | . | . | I | S | . | . | G | D | . | . | . | . | T | T | . | . | I | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | Q | E | A | I | S | . | . | G | . | E | . | . | . | T | . | T | . | S | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | Q | . | A | I | S | . | . | S | . | . | . | . | . | T | I | . | T | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | Q | . | . | I | S | . | . | S | D | E | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | Q | . | A | I | S | . | . | S | . | . | . | . | . | T | T | . | T | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | Q | . | . | L | . | . | . | S | D | E | . | . | . | T | . | T | . | M | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 109 |     |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | Q | . | . | L | G | . | . | A | D | . | . | . | . | T | . | T | . | A | V | G | . | . | R | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | Q | . | . | L | S | . | . | G | D | E | . | . | . | T | . | T | . | . | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | Q | . | . | L | R | . | . | . | D | . | D | . | . | T | . | T | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | Q | . | . | L | S | . | . | G | D | . | . | . | . | T | . | T | . | V | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | Q | . | . | L | S | . | . | G | N | . | . | . | . | M | . | T | . | E | V | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | Q | . | A | L | G | . | . | S | N | E | . | . | . | K | . | S | . | Q | Q | D | . | . | . | M | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | Q | . | A | L | G | . | . | S | N | E | . | . | . | K | . | T | . | Q | Q | D | . | . | . | M | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | Q | . | A | L | G | . | . | N | N | E | . | . | . | K | . | S | . | Q | Q | . | . | . | E | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | Q | . | A | L | G | . | . | N | N | E | . | . | . | K | . | S | . | Q | Q | . | . | . | E | . | . | . | . | . | 110 |     |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | Q | . | A | L | G | . | . | S | N | E | . | . | . | K | . | S | . | Q | Q | A | . | . | . | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | Q | R | A | L | D | . | . | S | N | E | . | . | . | K | . | S | . | R | Q | . | . | . | E | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | Q | R | A | L | G | . | . | K | D | E | . | . | . | K | . | S | . | R | Q | V | . | . | E | . | . | . | . | . | 111 |     |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | Q | W | A | L | G | . | . | K | D | E | . | . | . | K | . | S | . | R | Q | A | . | . | E | . | . | . | . | . | 111 |     |
| .                                                | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   |     |

|                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |     |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | V | L | P | D | I | G | K | V | F | K | L | E | A | V | V | E | K | P | L | D | S | V | Y | G | E | L | V | D   | 139 |     |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | .   | .   | 139 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | .   | .   | 139 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | H | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | .   | .   | 139 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | .   | .   | 139 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | R | . | . | . | . | . | . | .   | .   | 139 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | M | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | . | M | D | . | . | T | . | L | L | . | S | . | . | F | .   | 139 |     |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | . | L | D | Q | Y | P | . | R | L | . | . | . | . | . | .   | .   | 137 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | L | L | D | Q | R | P | . | N | L | . | . | . | . | . | .   | .   | 137 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | . | . | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | V | L | L | D | Q | R | P | . | N | L | . | . | . | . | . | .   | .   | 137 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | V | T | L | . | Q | Q | T | G | D | L | . | D | . | . | . | .   | .   | 137 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | M | L | . | Q | K | T | . | E | L | . | E | . | . | . | .   | .   | 137 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | M | L | . | Q | H | P | . | N | L | . | E | . | . | G | .   | 138 |     |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | V | L | L | D | Q | R | S | . | N | L | . | V | . | . | G | .   | 138 |     |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | . | V | A | G | V | . | . | . | . | . | . | . | V | . | . | D | Q | . | . | E | T | L | . | . | . | . | G | .   | 138 |     |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | M | L | . | Q | H | P | . | N | L | . | E | . | . | G | .   | 138 |     |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | . | . | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | V | . | L | D | Q | Q | T | . | N | . | . | K | . | . | N | .   | 137 |     |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | V | M | L | . | Q | H | P | . | D | L | . | K | . | . | G | .   | 137 |     |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | . | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | S | . | . | N | . | . | S | . | . | . | E | .   | 137 |     |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | . | . | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | . | . | . | . | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | . | . | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | . | . | A | . | . | S | . | . | . | . | .   | 139 |     |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | . | . | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | H | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | 139 |     |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | . | . | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | .   | 139 |     |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | . | . | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | . | . | A | . | . | S | . | . | . | . | .   | 139 |     |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | . | V | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | . | V | . | V | . | . | . | . | Q | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | M | V | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | . | R | L | . | E | . | . | . | . | 138 |     |     |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | . | V | G | V | . | . | . | . | R | . | . | V | L | L | D | Q | . | M | . | R | L | . | E | . | . | . | . | 138 |     |     |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | . | V | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | . | I | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | . | I | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | . | I | . | V | . | . | . | . | R | . | . | V | . | . | D | Q | . | M | E | R | L | . | E | . | . | . | E | .   | 139 |     |
|                                                  | . | . | . | . | * | * | . | * | . | * | * | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | * | . | * | * | . | . | .   | .   |     |

|                                                  | 144 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 157 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |
|--------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | N   | M | E | N | M | G | E | W | N | P | T | V | K | E   | I | K | I | L | Q | K | I | G | K | D | T | V | I | T   | 167 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | .   | . | . | K | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 167 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | .   | . | . | K | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 167 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | .   | . | . | S | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | . | . | . | R | . | . | N | . | . | . | . | . | .   | 167 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | K   | . | . | S | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | . | . | . | R | . | . | N | . | . | . | . | . | .   | 167 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | .   | . | . | R | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 167 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | R   | V | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | K | R | . | N | . | . | . | M | V | .   | 167 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | R | . | . | Q | . | . | M | V | . | 165 |     |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | . | . | . | R | . | . | Q | . | . | M | V | . | 165 |     |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | . | . | . | R | . | . | Q | . | . | M | V | . | 165 |     |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | Q | E | . | M | . | . | 165 |     |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | M | . | . | 165 |     |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | . | E | . | M | V | . | 166 |     |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | V   | . | . | . | . | . | . | . | Q | E | . | M | V | . | 166 |     |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | A | . | . | M | V | . | 166 |     |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | M | V | . | 166 |     |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | G   | . | . | D | . | . | . | . | . | . | S | . | . | Q   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | M | . | . | . | 165 |     |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | .   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | V   | . | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | M | . | . | 165 |     |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | R   | . | . | Q | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | . | . | . | E | . | . | . | . | . | . | . | . | 165 |     |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | R   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | S | . | Q | G   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | . | 167 |     |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | S | . | . | V   | . | . | . | . | R | V | . | . | . | L | . | . | . | 167 |     |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | V   | R | . | . | . | E | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | S | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | .   | . | . | Q | . | . | D | . | . | . | N | . | . | V   | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | . | 167 |     |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | . | 167 |     |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | V | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | 166 |     |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | V | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 166 |     |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | R   | . | . | T | . | . | . | . | . | . | N | . | . | V   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | S | . | K | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | S | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | I | . | . | . | 167 |     |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | R   | . | . | A | . | . | . | . | . | . | N | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 167 |     |
|                                                  | :   | * | : | * | * | : | * | * | * | : | * | : | : | :   | : | * | : | : | : | : | : | : | * | : | : | * | : | *   |     |

|                                                  | 169 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 182 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 193 |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|--------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
|                                                  | H   | E | K | A | A | E | T | P | G | N | I   | I | G | P | R | D | F | V | S | V | R   | C | S | K | R | R | G | S |   |     |
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | V | A | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | V | A | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | V | A | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | .   | . | . | . | . | . | . | A | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | N | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | A | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | N | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | .   | . | . | . | . | . | . | A | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | I | .   | . | N | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | Y   | . | A | S | . | . | . | A | . | . | .   | V | S | . | . | . | . | . | . | . | .   | Y | A | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | .   | . | M | . | . | . | . | A | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | .   | . | M | . | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | .   | . | M | . | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | .   | . | I | S | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | N | . | .   | H | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | .   | . | V | S | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | .   | . | V | S | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | .   | . | V | S | G | P | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | .   | . | V | S | G | D | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | .   | . | V | S | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | .   | . | V | S | . | . | . | . | . | . | .   | V | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | .   | . | T | . | . | A | . | A | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 193 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | .   | . | T | . | . | A | . | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | .   | . | T | . | . | A | P | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | R | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | .   | . | . | . | . | A | . | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | R | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | .   | . | . | . | . | A | . | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | .   | . | . | . | . | A | P | . | . | . | .   | . | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | .   | . | L | . | . | A | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | .   | . | M | . | . | A | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | .   | . | L | . | . | A | A | A | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | .   | . | L | R | . | A | A | A | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 194 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | .   | . | L | . | . | S | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | A | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | .   | . | L | . | . | A | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | .   | . | L | . | . | A | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 195 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | .   | . | L | . | . | A | A | . | . | . | .   | L | V | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | 195 |
|                                                  | .   | * | . | . | . | . | . | . | * | * | .   | . | . | . | * | * | * | * | . | . | *   | . | . | . | * | * | * | * | * | .   |

|                                                  | 203 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 212 |   |   |   |   | 217 |   |   |   |   | 218 |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|--------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
|                                                  | T   | C | I | L | A | G | M | S | T | R | F   | S | G | M | P | E   | Q | K | G | Y | V   | R | A | E | N | G | P | T |   |     |
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | G | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | G | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | I | .   | G | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | I | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | G | . | . | . | .   | . | . | . | I | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | .   | F | . | . | . | . | . | A | M | H | C   | N | L | . | . | Q   | . | N | . | F | I   | . | G | . | . | . | . | . | S | 223 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Y   | T | . | . | . | .   | . | . | . | F | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | H   | Y | A | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC86210.1)            | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | H   | Y | A | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | H | P | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | H | P | . | . | .   | . | . | . | F | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | K   | H | P | T | . | .   | . | R | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 222 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | H | P | T | . | .   | . | R | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 222 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | .   | F | . | . | . | . | K | . | . | . | Q   | H | P | . | . | .   | . | . | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 222 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | H | P | K | . | .   | . | R | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 222 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | S   | F | . | . | . | . | I | A | . | . | .   | A | E | . | . | .   | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | .   | F | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | H | P | K | . | .   | . | R | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | .   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | T   | Y | A | A | . | .   | . | . | . | V | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 221 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | . | K   | H | G | A | . | .   | . | . | . | F | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | .   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | T   | H | G | A | . | .   | . | Q | . | F | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | .   | V | . | . | . | . | . | . | . | . | T   | Y | G | A | . | .   | . | E | . | F | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | . | K   | H | G | A | . | .   | . | E | . | F | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | . | Q   | Y | G | A | V | .   | . | E | . | F | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | 223 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | .   | V | . | . | . | . | . | D | . | D | .   | G | N | . | . | .   | . | . | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 223 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | D | .   | G | N | . | . | .   | . | . | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 223 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | H | .   | G | E | . | . | .   | . | S | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 222 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | H | .   | G | E | . | . | .   | . | S | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 222 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | .   | V | . | . | . | . | . | A | . | H | .   | G | E | . | . | .   | . | . | . | V | I   | . | G | . | H | . | . | . | . | 223 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | V   | V | . | . | . | . | . | A | . | D | .   | G | E | . | . | .   | . | . | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 223 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | M   | V | . | . | . | . | . | T | A | . | L   | Y | E | E | . | .   | Q | . | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 223 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | M   | V | . | . | . | . | . | A | . | L | Y   | E | E | . | . | .   | Q | . | . | V | I   | . | . | . | H | . | . | . | . | 223 |
|                                                  | *   | . | * | * | * | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | *   | . | * | . | * | .   | * | . | * | * | . | * | * | . | .   |

|                                                  | 225 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 250 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |
|--------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | C   | M | V | L | H | P | V | L | E | D | P   | S | K | T | K | L | T | W | L | L | S | I | D | L | K | G | W | L | 251 |     |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | .   | . | . | . | R | . | L | A | . | . | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | .   | . | . | . | R | . | L | A | . | . | I   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | .   | I | . | . | C | . | S | A | . | . | N   | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | .   | I | . | . | R | . | N | A | . | . | T   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | .   | I | . | M | R | . | S | T | . | . | D   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | .   | I | . | M | R | . | S | A | . | . | D   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | .   | I | . | M | R | . | S | A | D | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | .   | I | . | M | R | . | S | E | . | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | N | L | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | .   | I | . | . | K | . | C | A | . | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | .   | I | . | M | R | . | S | A | D | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | .   | I | . | . | K | . | D | A | A | . | N   | Q | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | .   | I | . | M | K | . | C | A | . | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | .   | I | . | . | . | . | S | A | . | . | T   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | .   | I | . | M | K | . | C | A | . | . | N   | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | .   | . | . | . | R | . | . | A | G | . | .   | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 249 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | .   | . | I | . | R | . | L | A | . | N | .   | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | .   | . | . | . | R | . | L | A | G | S | .   | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | .   | . | . | . | R | . | L | P | G | S | .   | Q | N | R | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | Q | . | .   | 251 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | .   | . | I | . | R | . | L | P | G | S | .   | Q | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | .   | . | L | . | R | . | L | Q | G | R | .   | Q | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | .   | . | . | . | . | . | L | A | G | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | .   | . | . | . | . | . | L | A | G | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | .   | . | . | . | . | . | L | A | G | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | .   | . | . | . | . | . | L | A | G | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 250 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | .   | . | . | . | . | . | L | A | Q | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | .   | . | . | . | . | . | L | A | G | S | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | .   | . | . | . | R | . | L | A | G | S | .   | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | .   | . | . | . | R | . | L | A | G | S | .   | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | 251 |
|                                                  | *   | : | : | : | * | . | . | . | . | . | :   | . | . | . | . | * | * | * | * | . | . | * | * | . | * | * | . | . |     |     |

|                                                  | 258 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 260 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 275 |   |   |   |   |   |   |     |     |  |
|--------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|-----|-----|--|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | P   | K | S | I | I | N | Q | V | L | S | Q   | T | Q | V | D | F | A | K | H | L | R   | N | R | V | A | M | S | T   | 279 |  |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S   | . | M | T | S | . | S | 279 |     |  |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S   | . | M | V | S | . | S | 279 |     |  |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S   | . | . | . | . | . | S | 279 |     |  |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S   | . | . | . | . | Y | S | 279 |     |  |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S   | . | . | . | . | . | S | 279 |     |  |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS64370.1)         | .   | . | L | . | . | K | A | . | C | . | .   | . | A | . | . | . | . | Q | C | . | Q   | H | M | N | S | K | A | 277 |     |  |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | M | . | . | . | . | Q | . | . | D   | . | M | E | T | - | - | 275 |     |  |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | .   | . | T | . | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | Q   | . | M | . | A | G | - | 276 |     |  |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | .   | . | T | . | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | Q   | . | M | . | A | G | - | 276 |     |  |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | .   | . | T | V | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | V | . | N | . | . | D   | . | M | . | S | G | - | 276 |     |  |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | .   | . | T | V | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | H   | . | M | . | S | . | - | 276 |     |  |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | .   | . | T | . | . | K | . | . | F | . | .   | . | . | . | . | . | . | S | . | . | Q   | . | M | . | H | N | - | 277 |     |  |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | .   | . | T | . | . | K | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | M | . | D | N | S | 278 |     |  |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | .   | . | T | . | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | M | . | S | N | - | 277 |     |  |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | .   | . | T | . | . | R | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | M | . | N | N | - | 277 |     |  |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | Q | . | . | Q   | . | M | . | V | . | - | 276 |     |  |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | .   | . | T | . | . | K | . | . | A | . | .   | . | . | . | . | . | . | S | . | . | Q   | . | M | . | N | N | - | 276 |     |  |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | .   | . | T | L | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | H   | . | L | . | N | P | S | 277 |     |  |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | Q | . | K   | . | L | . | S | T | A | 279 |     |  |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Q   | . | M | . | R | A | A | 279 |     |  |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | .   | . | T | . | . | . | F | . | . | . | .   | . | W | . | . | . | . | . | . | W | .   | K | . | L | P | R | P | V   | 279 |  |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | L | . | R | - | - | 277 |     |  |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | .   | . | . | . | . | . | . | . | A | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | Q   | . | L | . | R | T | A | 279 |     |  |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | K   | . | L | E | S | H | P | 279 |     |  |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | .   | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | R   | . | L | E | S | R | P | 279 |     |  |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | I | E | . | . | . | N | . | . | K   | . | L | E | A | . | P | 278 |     |  |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | I | E | . | . | . | S | . | . | K   | . | L | E | S | . | P | 278 |     |  |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | K   | H | L | E | S | . | P | 279 |     |  |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | K   | . | L | E | S | R | P | 279 |     |  |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | K   | . | L | E | S | C | P | 279 |     |  |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | .   | . | T | . | . | . | . | . | . | . | .   | . | . | . | . | . | . | N | . | . | K   | . | L | E | S | C | P | 279 |     |  |
|                                                  | *   | * | : | : | * | * | : | * | * | * | *   | * | * | * | : | * | . | . | . | * | .   | : | : | . | . | . | . | .   |     |  |

|                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|--------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| <i>Rhinella arenarum</i> (AMD33476.1)            | A | S | L | S | L | C | — | — | — | 285 |
| <i>Xenopus laevis</i> (NP001167502)              | N | A | . | . | . | . | — | — | — | 285 |
| <i>Silurana tropicalis</i> (XP 002932770)        | N | A | . | . | . | . | — | — | — | 285 |
| <i>Lithobates catesbeianus</i> (ACJ53927.1)      | N | — | V | . | . | . | — | — | — | 284 |
| <i>Glandirana rugosa</i> (BAH09112.1)            | N | — | V | . | . | . | — | — | — | 284 |
| <i>Nanorana parkeri</i> (XP 018422163.1)         | N | — | . | . | . | . | — | — | — | 284 |
| <i>Potamotrygon hystrix</i> (AAS84370.1)         | . | A | N | . | Y | — | — | — | — | 284 |
| <i>Acipenser transmontanus</i> (ACI23577.1)      | — | — | — | — | I | A | L | P | C | 280 |
| <i>Anguilla australis</i> (AGC29941.1)           | Y | . | M | E | A | A | Q | A | C | 285 |
| <i>Anguilla japonica</i> (BAC66210.1)            | Y | . | M | E | A | A | Q | A | C | 285 |
| <i>Danio rerio</i> (NP571738.1)                  | G | G | I | D | A | A | I | A | C | 285 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (ACD37725.1)              | G | G | V | E | A | A | I | A | C | 285 |
| <i>Micropogonias undulatus</i> (ABG34343.1)      | V | F | M | E | M | A | H | A | C | 286 |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001117674.1)       | V | . | M | E | M | A | A | A | C | 287 |
| <i>Gadus morhua</i> (AAP44112.1)                 | V | . | . | E | M | A | P | A | C | 286 |
| <i>Sparus aurata</i> (ABV25959.1)                | V | . | M | E | M | A | H | A | C | 286 |
| <i>Latimeria chalumnae</i> (XP 006000418.1)      | P | F | A | M | A | T | N | V | C | 285 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> (XP 003445653.1)    | V | . | V | E | M | S | P | A | W | 285 |
| <i>Pogona vitticeps</i> (XP 020641819)           | L | . | A | Q | A | L | R | C | — | 285 |
| <i>Crocodylus porosus</i> (XP 019401652)         | P | P | A | V | A | I | N | C | — | 287 |
| <i>Gallus gallus</i> (NP990017.1)                | G | — | — | C | — | — | — | — | — | 281 |
| <i>Taeniopygia guttata</i> (NP001070154.1)       | P | V | A | C | — | — | — | — | — | 283 |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> (OPJ83898.1) | T | A | A | C | — | — | — | — | — | 281 |
| <i>Amazona aestiva</i> (KQK82357.1)              | . | P | Q | C | — | — | — | — | — | 283 |
| <i>Homo sapiens</i> (NP000340.2)                 | . | . | E | A | R | . | — | — | — | 285 |
| <i>Macaca mulatta</i> (EHH28420.1)               | . | . | E | A | R | . | — | — | — | 285 |
| <i>Mus musculus</i> (NP 035615.2)                | . | . | E | A | Q | . | — | — | — | 284 |
| <i>Rattus norvegicus</i> (NP113746.1)            | . | . | E | A | Q | . | — | — | — | 284 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> (NP 001091011.1)   | . | P | E | A | R | . | — | — | — | 285 |
| <i>Sus scrofa</i> (NP 998920.2)                  | . | L | E | A | R | . | — | — | — | 285 |
| <i>Ovis aries</i> (NP 001009243.1)               | . | L | E | A | R | . | — | — | — | 285 |
| <i>Bos taurus</i> (NP 776614.1)                  | . | L | E | A | R | . | — | — | — | 285 |

**Figura 29:** Alineación múltiple de secuencias aminoacídica de StAR realizada con el programa Clustal Omega. Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias son indicados con un asterisco (\*). Las sustituciones aminoacídicas conservativas se indican con dos puntos (:) y las semiconservativas con un punto (.). Los rectángulos indican los motivos conservados para la fosforilación por PKA. Los sitios putativos de unión a colesterol del dominio START-STARD1-like se indican sombrados en gris. Las mutaciones que resultan en hiperplasia suprarrenal congénita lipoide en humanos se indican sobre la secuencia de *R. arenarum* con los números de posición (M144R, L157P, E169K, E169G, R182L, R182H, R193X, Q212X, R217T, A218V, M225T, W250X, Q258X, L260P y L275P). Los números a la derecha, en cada hoja, corresponden a la cantidad parcial de aminoácidos de cada secuencia.

De manera general, tomando los datos obtenidos con el programa Clustal Omega y considerando que la cantidad total de aminoácidos de la secuencia correspondiente a *R. arenarum* es de 285, podemos calcular que un 30,5% de los aminoácidos de las secuencias alineadas son iguales y un 34% fueron cambios de aminoácidos por otros que poseen características fisicoquímicas similares.

En la figura 29 también se pueden observar, para todas las especies alineadas, las distintas características mencionadas en el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína StAR de *R. arenarum*. Entre esas características tenemos la presencia de los dos dominios principales de la proteína definidos a partir del análisis funcional realizado en humanos (Arakane y col, 1996; Wang y col. 1998). Uno de los dominios es el correspondiente a la secuencia N-terminal de orientación mitocondrial, formado por los primeros 26 aminoácidos. El análisis de este dominio muestra que en las 6 especies de anfibios la secuencia es idéntica. Sin embargo, la comparación de los anfibios con los peces muestra que hay tres sustituciones, dos no conservativas, en las posiciones 17 y 26, y una conservativa, en el aminoácido 25. Mientras que comparando el dominio del grupo de los anfibios con el del grupo de los mamíferos, en el cual se caracterizó la función, a los cambios detallados se les suman otros cambios no conservativos (posiciones 3, 12 y 21). En la figura 29 también se detallan, sombreados en gris, los sitios putativos de unión a lípidos, correspondientes al dominio conservado de unión a colesterol START-STARD1-like, mencionado anteriormente. Estos sitios se encuentran ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia y forman una estructura de túnel hidrofóbico que estaría directamente relacionada con el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Clark, 2012). Los sitios mencionados se obtuvieron analizando la secuencia de *R. arenarum* en el BLASTP, sección del programa BLAST, en la cual se trabaja con las secuencias aminoacídicas. En total, son 44 los aminoácidos señalados en la base de datos como posibles sitios

de unión a lípidos. Entre las 32 secuencias de especies utilizadas en la alineación, de esos 44 aminoácidos, 25 están conservados (56,8%) y 11 reemplazados con sustituciones conservativas (25%).

La función de StAR en la síntesis de esteroides se estudió ampliamente en humanos cuando se descubrió que mutaciones en el gen de la mencionada proteína son la causa de la enfermedad potencialmente letal conocida como hiperplasia suprarrenal congénita lipóide (Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia, CLAH), una afección caracterizada por una incapacidad casi completa del recién nacido de sintetizar esteroides y la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de las células esteroideogénicas. El defecto en la síntesis de esteroides en la CLAH es causado por la falla en el transporte de colesterol a la membrana interna de las mitocondrias, lo que demuestra el papel esencial de StAR en dicho transporte. Además, los ratones StAR *null* muestran un fenotipo que es esencialmente idéntico a la patología humana (Stocco, 2002). Las mutaciones en el gen de StAR que en humanos resultan en CLAH fueron informadas en diversos estudios. Los residuos aminoacídicos donde ocurren las mutaciones mencionadas son E169, R182, R193, D203A, Q212, R217, A218V, M225, W250, Q258, L275P (Bose y col., 2000; Stocco, 2002), M144R (Chen y col., 2005), y L157P, L260P (Flück y col., 2005). En *R. arenarum*, los aminoácidos cuyas mutaciones causan CLAH en humanos, son idénticos a la forma normal de StAR humana o sustituidos conservativa (L275V) y semiconservativamente (D203S). Estas posiciones se indican en la figura 29 con el número de aminoácido correspondiente en la parte superior de la alineación.

Cuando se quiere evaluar la calidad de un alineamiento son muy importantes las definiciones de identidad y similitud. La identidad es la suma de residuos idénticos en posiciones equivalentes en dos secuencias alineadas. Se supone que estos residuos formaban parte de una secuencia ancestral de la que descienden ambas secuencias y que durante la evolución han permanecido invariables. La similitud es la suma de puntuaciones correspondientes a residuos en posiciones equivalentes en dos secuencias alineadas, dichas puntuaciones suelen estar tabuladas e incluir penalizaciones para inserciones y deleciones (también llamados gaps). Las tablas de puntuaciones de sustitución de un residuo por otro se denominan matrices de sustitución (Álvaro, 2014). En particular, la que se utilizó en este trabajo se denomina BLOSUM (BLOCKS of Amino Acid SUBstitution Matrix), creada a partir de datos que caracterizan a más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, 1992).

Para evaluar la calidad del alineamiento obtenido se utilizó la herramienta computacional SIAS (Sequence Identity And Similarity) usando la matriz de sustitución BLOSUM62 que agrupa a las proteínas con identidad mayor o igual al 62%. El resultado obtenido se detalla en la tabla 5.

| <b>Especie</b>                      | <b>Identidad<br/>Clustal</b> | <b>Similitud<br/>Clustal</b> | <b>Identidad<br/>MUSCLE</b> | <b>Similitud<br/>MUSCLE</b> |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Rhinella arenarum</i>            | 100,00%                      | 100,00%                      | 100,00%                     | 100,00%                     |
| <i>Nanorana parkeri</i>             | 92,60%                       | 95,42%                       | 92,60%                      | 95,07%                      |
| <i>Lithobates catesbeianus</i>      | 91,54%                       | 94,36%                       | 91,54%                      | 94,01%                      |
| <i>Glandirana rugosa</i>            | 91,19%                       | 94,01%                       | 91,19%                      | 93,66%                      |
| <i>Silurana tropicalis</i>          | 87,36%                       | 91,92%                       | 87,36%                      | 91,92%                      |
| <i>Xenopus laevis</i>               | 87,36%                       | 91,92%                       | 87,36%                      | 91,92%                      |
| <i>Patagioenas fasciata monilis</i> | 76,51%                       | 85,76%                       | 76,86%                      | 86,47%                      |
| <i>Latimeria chalumnae</i>          | 76,49%                       | 82,80%                       | 77,54%                      | 84,21%                      |
| <i>Acipenser trasmontanus</i>       | 76,07%                       | 84,64%                       | 76,78%                      | 85,35%                      |
| <i>Gallus gallus</i>                | 75,44%                       | 84,69%                       | 75,80%                      | 85,05%                      |
| <i>Crocodylus porosus</i>           | 75,43%                       | 84,56%                       | 76,14%                      | 85,26%                      |
| <i>Taeniopygia guttata</i>          | 74,55%                       | 83,74%                       | 74,91%                      | 84,09%                      |
| <i>Pogona vitticeps</i>             | 74,38%                       | 82,10%                       | 74,73%                      | 82,45%                      |
| <i>Anguilla australis</i>           | 74,03%                       | 82,45%                       | 74,03%                      | 82,80%                      |
| <i>Amazona aestiva</i>              | 73,85%                       | 81,62%                       | 73,85%                      | 81,62%                      |
| <i>Anguilla japónica</i>            | 73,68%                       | 82,45%                       | 73,68%                      | 82,80%                      |
| <i>Oreochromis niloticus</i>        | 72,28%                       | 78,94%                       | 72,28%                      | 78,59%                      |
| <i>Sparus aurata</i>                | 70,52%                       | 77,54%                       | 70,87%                      | 78,24%                      |
| <i>Homo sapiens</i>                 | 70,17%                       | 77,19%                       | 70,17%                      | 77,19%                      |
| <i>Cyprinus carpio</i>              | 69,82%                       | 76,49%                       | 70,52%                      | 76,84%                      |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>          | 69,47%                       | 78,59%                       | 69,82%                      | 78,59%                      |
| <i>Micropogonia undulatus</i>       | 69,12%                       | 76,84%                       | 69,82%                      | 77,89%                      |
| <i>Macaca mulata</i>                | 68,77%                       | 75,43%                       | 68,77%                      | 75,43%                      |
| <i>Cannis lupus familiaris</i>      | 68,07%                       | 78,24%                       | 68,07%                      | 78,24%                      |
| <i>Gadus morhua</i>                 | 67,36%                       | 76,84%                       | 67,36%                      | 77,19%                      |
| <i>Sus scrofa</i>                   | 67,36%                       | 76,84%                       | 67,36%                      | 76,84%                      |
| <i>Danio rerio</i>                  | 66,31%                       | 74,73%                       | 67,01%                      | 75,08%                      |
| <i>Mus musculus</i>                 | 66,19%                       | 75,00%                       | 66,19%                      | 75,00%                      |
| <i>Rattus norvegicus</i>            | 65,84%                       | 75,35%                       | 65,84%                      | 75,35%                      |
| <i>Bos taurus</i>                   | 64,56%                       | 74,73%                       | 64,56%                      | 74,73%                      |
| <i>Ovis aries</i>                   | 64,21%                       | 75,43%                       | 64,21%                      | 75,43%                      |
| <i>Potamotrygon hystrix</i>         | 61,61%                       | 71,83%                       | 61,26%                      | 71,47%                      |

**Tabla 5:** Porcentajes de identidad y similitud de las secuencias aminoacídicas de StAR de distintas especies de vertebrados comparadas con la secuencia obtenida para *R. arenarum*, mediante el análisis de alineamiento realizado con los programas Clustal y MUSCLE.

Los resultados en cuanto a identidad y similitud calculados sobre las alineaciones realizadas con los distintos programas, que utilizan algoritmos diferentes, permiten suponer que la calidad del alineamiento de la secuencia de StAR de *R. arenarum* con cada una de las secuencias analizadas es buena. Esto es así dado que los porcentajes para identidad y para similitud son semejantes para la misma especie entre el Clustal y el MUSCLE.

Cuando se analizan los anfibios anuros en particular, se puede ver que la secuencia de *R. arenarum* se encuentra más cercana a las especies de la familia Ranidae que a las de la familia Pipidae, de caracteres derivados más tempranamente durante la evolución. Esto se observa marcadamente en el porcentaje de identidad, es decir en la cantidad de aminoácidos iguales que tienen las secuencias, pero no es tan acentuada la diferencia cuando se analiza la similitud. Si comparamos a *R. arenarum* con los amniotas podemos ver que la acumulación de cambios de aminoácidos fue mayor en los mamíferos, cuyo porcentaje de identidad está entre un 70% y un 64%, mientras que los saurópsidos comparten un porcentaje de identidad entre el 77% y 74%. Dentro de los anamniotas, para los peces se puede observar que se obtuvieron mayores porcentajes tanto de identidad como de similitud entre *R. arenarum* y las especies de origen más temprano, como son *A. transmontanus*, *A. japonica* y *A. australis*. En la similitud se observa un cambio mayor en el porcentaje de las especies mencionadas comparándolas con otros peces considerados de origen tardío, como lo son *O. niloticus*, *M. undulatus* y *S. aurata*. El porcentaje de similitud de *R. arenarum* con estas últimas especies es parecido al porcentaje de similitud de *R. arenarum* y *H. sapiens*.

#### Análisis filogenético

El objetivo de los métodos de reconstrucción filogenética es utilizar del mejor modo posible la información obtenida de las especies actuales para hacer inferencias acerca del pasado, es decir, para elaborar hipótesis que sean lo más fiables posibles. En el caso de la filogenia molecular, la información utilizada para hacer las inferencias puede estar dada por las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas. En este capítulo, el análisis filogenético basado en la alineación de múltiples secuencias de la proteína StAR de distintas especies buscó evaluar las relaciones filogenéticas determinadas a partir de ese carácter molecular y la magnitud del componente filogenético en la variabilidad de la secuencia.

Para esto, se analizaron las alineaciones realizadas utilizando el método de MV. Como se mencionó anteriormente, se utilizó a *P. hystrix*, un pez cartilaginoso, como grupo

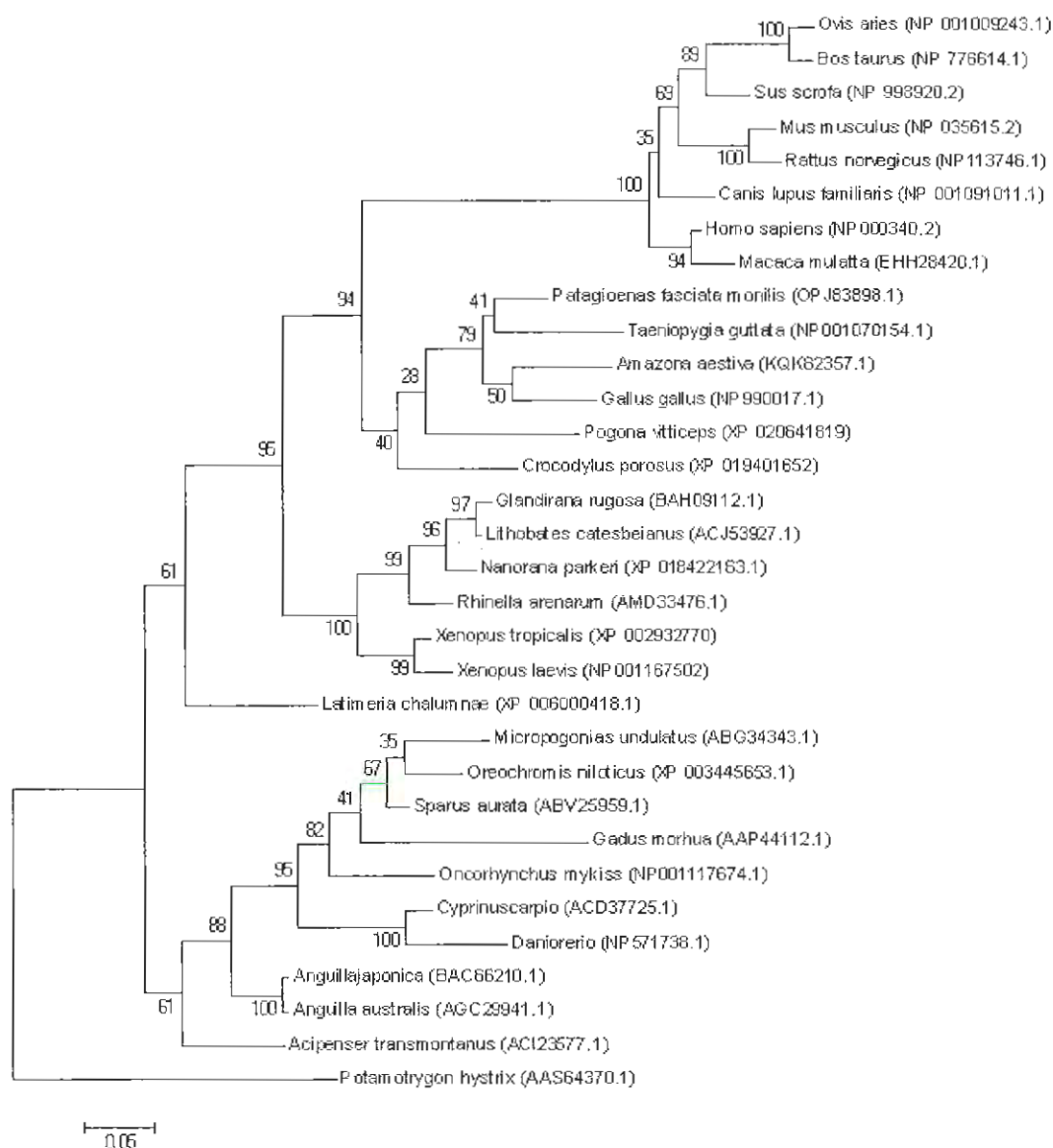
externo para el enraizamiento de los árboles y su consecuente polarización de caracteres.

Lo primero que se analizó fue la topología de los árboles obtenidos a partir de los distintos alineamientos. Para cada caso, además, se utilizó el mismo modelo evolutivo pero con distinta tasa de cambio; una tasa de cambio uniforme y otra con sitios invariantes (+I). De manera general, podemos observar que de los cuatro árboles (Figuras 30-33), el árbol obtenido con la alineación del Clustal Omega, cuya tasa de cambio se fijó como uniforme (Figura 30), tiene una topología que refleja fidedignamente las relaciones filogenéticas existentes con respecto a los nodos formados según la clase taxonómica de las especies utilizadas. La formación del nodo que agrupa a los Actinopterygios y del nodo que agrupa a los Sarcopterygios se da únicamente en los árboles cuya tasa de cambio se determinó como uniforme, independientemente del método de alineamiento utilizado (Clustal, Figura 30; MUSCLE, Figura 31). La topología de los árboles cuya tasa de cambio se determinó como con sitios invariantes (+I) no muestra la formación de dichos nodos (Clustal+I Figura 32, MUSCLE+I Figura 33). A diferencia de lo que ocurre con la topología del árbol de la figura 30, en el árbol de la figura 31 no se forma el nodo de los Saurópsidos. Los números en cada nodo indican el score o puntaje del "bootstrap" de 500 repeticiones, es decir, el porcentaje de veces en las que se repitió dicha rama en el testeo del árbol. Este valor es alto para todos los árboles en los nodos que agrupan a: tetrápodos (entre un 94 y 95%), al clado de los amniotas (entre un 88 y 95%), los anfibios (entre un 99 y 100%) y mamíferos (100%). Además, en los árboles donde se forman el nodo de los Actinopterygios el porcentaje obtenido fue de 61% o 65% (Figuras 30 y 31) como consecuencia del agregado de la secuencia de *L. chalumnae*, una de las especies vivientes de la subclase Coelacanthimorpha de la clase Sarcopterygii. Antes de este agregado el porcentaje del nodo Actinopterygii era de 85% (árbol no mostrado). Si bien el porcentaje varía bastante, los valores obtenidos con el agregado son los suficientemente altos como para confiar en la topología del árbol. Hay que tener en cuenta que estos resultados son la consecuencia del agregado de una única especie de sarcopterygio de las ocho especies vivientes. Sería conveniente repetir los alineamientos en el futuro cuando se cuente con más secuencias de StAR de otras especies de sarcopterygios.

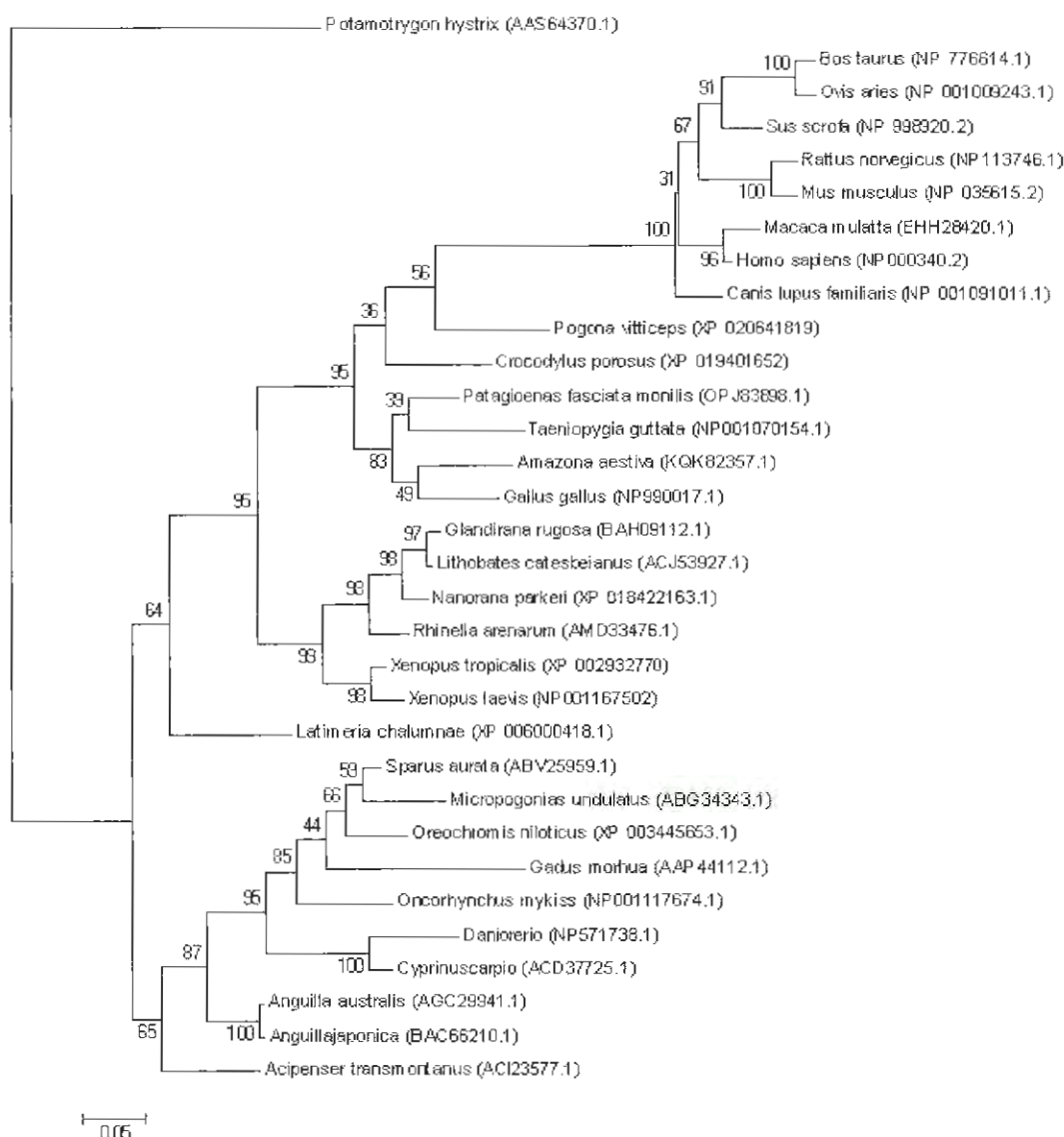
Además, de la comparación realizada entre los distintos árboles se puede deducir que la secuencia de la proteína StAR obtenida para *R. arenarum* se ubica dentro del grupo de los anfibios, cuya rama es robusta dado que se formó en el 99% o más de los casos durante el testeo del árbol. Por otra parte, si bien son muy pocas las familias

representadas, éstas están ordenadas como se muestra en el árbol filogenético de los anfibios (AmphibiaWeb, 2018). Así, vemos a *R. arenarum*, de la familia Bufonidae, cercano a la especie de la familia Dicroglossidae, *N. parkeri* y ambas, a su vez, cercanas a las 2 especies de la familia Ranidae, *L. catesbeianus* y *G. rugosa*. Las especies de la familia Pipidae se agrupan en una rama aparte dentro del nodo de los anfibios. Hay que tener en cuenta que se considera que los miembros de esta familia han divergido mucho más tempranamente. Estos resultados son consistente con los obtenidos utilizando los porcentajes de identidad y similitud, lo cual nos permite suponer que la secuencia de la proteína StAR de distintas especies podría ser utilizadas como carácter molecular para ayudar al establecimiento de relaciones evolutivas mediante la construcción de árboles filogenéticos.

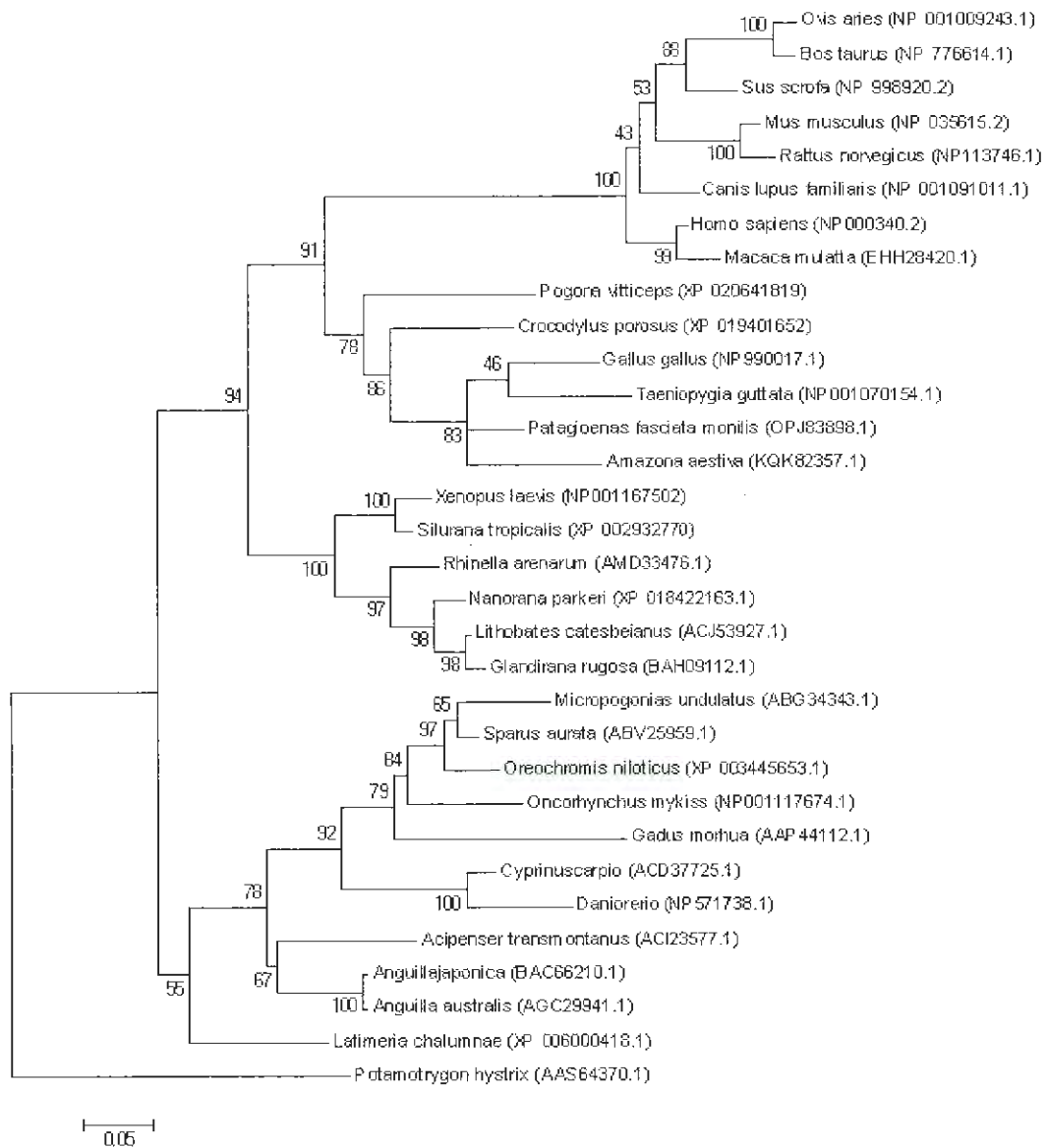
Por otra parte, los árboles están contruidos a escala y el largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio. Las longitudes de las ramas muestran que dentro de los tetrápodos StAR de anfibios acumuló menos cambios aminoacídicos que la proteína de los mamíferos analizados, independientemente del análisis filogenético realizado. Esto es consistente con los resultados del análisis de la alineación de las secuencias, donde se observó que el grupo que mostraba mayor cantidad de cambios en la secuencia, en aquel caso con respecto a la secuencia de *R. arenarum*, eran el de los mamíferos.



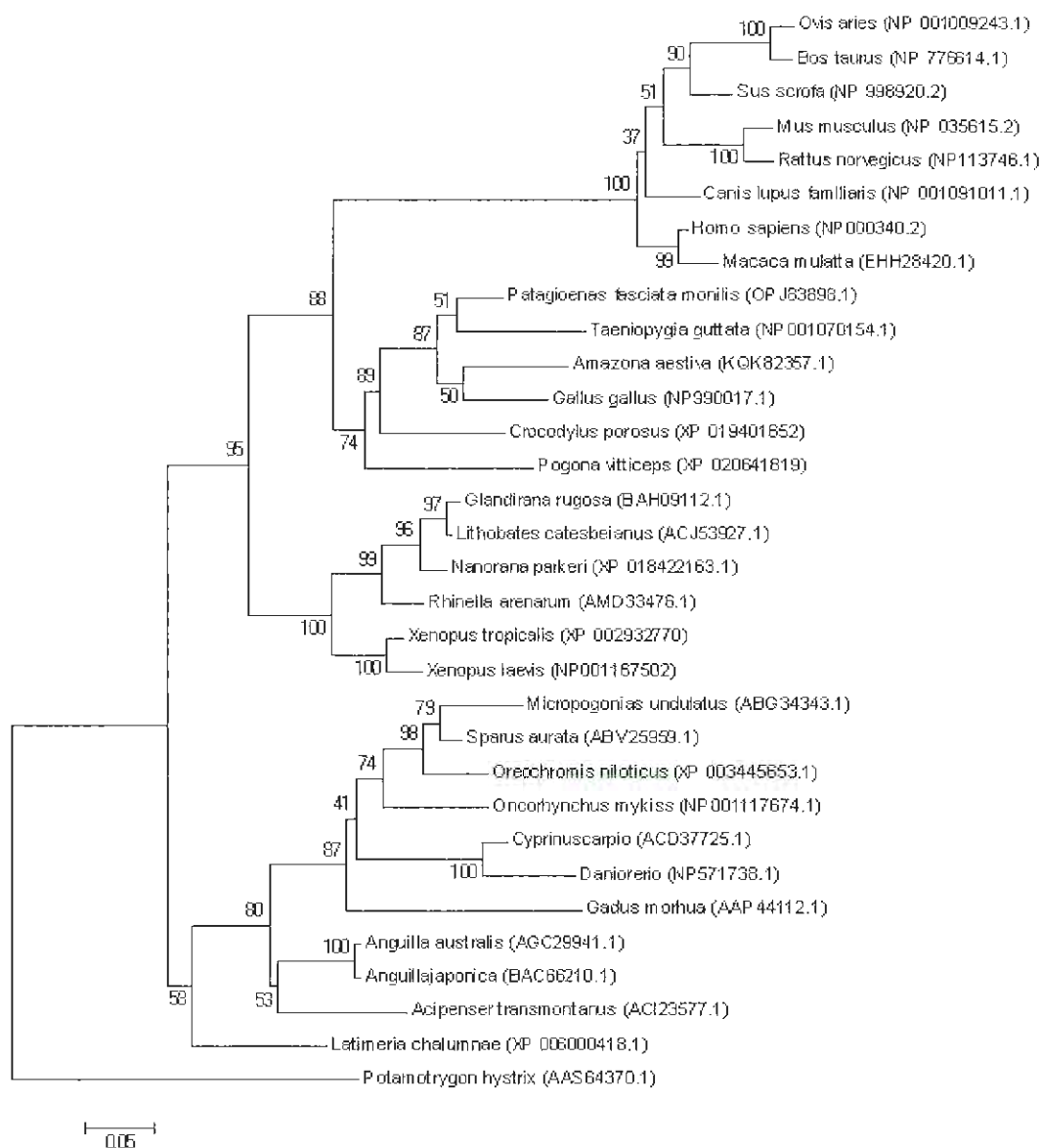
**Figura 30:** Análisis filogenético de la proteína StAR. Las relaciones fueron inferidas utilizando el alineamiento realizado con el Clustal y el método de máxima verosimilitud, con una tasa de cambio uniforme, del programa MEGA 6.0. El número de acceso de la base de datos GenBank para cada secuencia aminoacídica se indica entre paréntesis. Los números debajo de las ramas indican el puntaje del "bootstrap" de 500 repeticiones, es decir, el porcentaje de veces en las que se repitió dicha rama en el testeo del árbol. El árbol está construido a escala y el largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio.



**Figura 31:** Análisis filogenético de la proteína StAR. Las relaciones fueron inferidas utilizando el alineamiento realizado con el MUSCLE y el método de máxima verosimilitud, con una tasa de cambio uniforme, del programa MEGA 6.0. El número de acceso de la base de datos GenBank para cada secuencia aminoacídica se indica entre paréntesis. Los números debajo de las ramas indican el puntaje del "bootstrap" de 500 repeticiones, es decir, el porcentaje de veces en las que se repitió dicha rama en el testeo del árbol. El árbol está construido a escala y el largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio.



**Figura 32:** Análisis filogenético de la proteína StAR. Las relaciones fueron inferidas utilizando el alineamiento realizado con el Clustal y el método de máxima verosimilitud, con una tasa de cambio con sitios invariantes, del programa MEGA 6.0. El número de acceso de la base de datos GenBank para cada secuencia aminoacídica se indica entre paréntesis. Los números debajo de las ramas indican el puntaje del "bootstrap" de 500 repeticiones, es decir, el porcentaje de veces en las que se repitió dicha rama en el testeo del árbol. El árbol está construido a escala y el largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio.



**Figura 33:** Análisis filogenético de la proteína StAR. Las relaciones fueron inferidas utilizando el alineamiento realizado con el MUSCLE y el método de máxima verosimilitud, con una tasa de cambio con sitios invariantes, del programa MEGA 6.0. El número de acceso de la base de datos GenBank para cada secuencia aminoacídica se indica entre paréntesis. Los números debajo de las ramas indican el puntaje del "bootstrap" de 500 repeticiones, es decir, el porcentaje de veces en las que se repitió dicha rama en el testeo del árbol. El árbol está construido a escala y el largo de las ramas representa el número de sustituciones por sitio.

### Expresión diferencial de StAR

En *R. arenarum*, la expresión del ARNm de StAR se evaluó en distintos órganos, esteroidogénicos y no esteroidogénicos. Para ello, se utilizó el ADNc obtenido mediante RT-PCR del ARN total de cerebro, testículo, interrenal, órgano de Bidder, piel e hígado. El órgano de Bidder se escogió debido a que es una estructura característica de los bufónidos que sintetiza estradiol a partir de sustratos endógenos y de testosterona testicular (Scaia y col., 2011). La figura 34 muestra los resultados obtenidos. En ella puede verse que si bien es evidente la presencia de GAPDH en todos los órganos sólo en interrenal y testículo puede verse una banda correspondiente a un fragmento de StAR. Cabe aclarar que los intentos realizados por obtener productos de PCR a partir del ADNc de testículo fueron fallidos, aunque se ensayaron diversas condiciones (datos no mostrados). Fue necesario obtener el ARNm total, luego el ADNc y, finalmente, se consiguió visualizar el producto de PCR correspondiente a un fragmento del ARNm de la proteína buscada. La presencia del ARNm de StAR en testículo fue descrita en otros dos anfibios anuros, *L. catesbeianus* (Paden y col., 2010) y *P. esculentus* (Burrone y col., 2012). Sin embargo, en ambas especies se describió su expresión también en cerebro (Paden y col., 2010; Santillo y col., 2017) y en la piel e interrenal de *L. catesbeianus* (Paden y col., 2010). La expresión en interrenal en la rana toro se debe inferir, dado que es la estructura esteroidogénica, pues para los ensayos dicha glándula fue utilizada junto con el riñón (Paden y col., 2010).

Los resultados obtenidos no nos permiten descartar la presencia de ARNm de StAR en otros tejidos, particularmente en cerebro, para el que fue descrito en los trabajos mencionados. Por otra parte, no es extraño la falta de señal en el órgano de Bidder ya que esta estructura contiene ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos, que aportan una gran cantidad de ARNm y, además, tal como fuera informado no todos los folículos poseen células foliculares que expresen el Cyp450scc por lo que no todos requerirían del transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Scaia y col., 2011).



**Figura 34:** Fotografía de un gel de agarosa 2% en el que se revelan los productos de PCR de StAR y GAPDH utilizando el ADNc obtenido a partir del ARNm total de testículo y del ARN total para el resto de los tejidos indicados en cada calle. CN: control negativo. Test: Testículo, Inter: Interrenal, O.Bid: Órgano de Bidder.

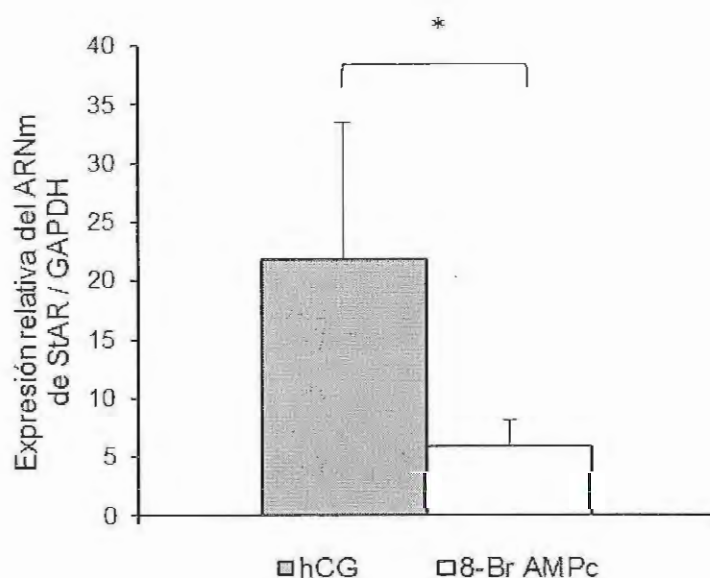
#### Efecto de reguladores de la esteroidogénesis sobre la expresión de StAR

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos cuando se midió la proteína (ver Capítulo 2) y determinar si la falta de efecto de algunos reguladores se debía a problemas de sensibilidad en la determinación, se estudió el efecto de dos estimuladores de la esteroidogénesis testicular sobre la expresión del ARNm de StAR. Para ello, se realizaron los diseños experimentales detallados en Materiales y Métodos, usando las concentraciones máximas de hCG (40 UI/ml) y de 8-Br-AMPC (1 mM), probadas en el Capítulo 2. Para la cuantificación por PCR en tiempo real se utilizaron primers específicos para StAR y GAPDH (Tabla 6).

| Nombre                 | Secuencia             |
|------------------------|-----------------------|
| StARRealTFw (Tm 60°C)  | GCATTGACTTAAAGGGCTGG  |
| StARRealTRv (Tm 58°C)  | GAACGGTTAGCAGAGTGACAG |
| GAPDHRealTFw (Tm 62°C) | CCCATCACCGTCTCTCAGG   |
| GAPDHRealTRv (Tm 62°C) | CGCTTGGCACCTCCTTTC    |

**Tabla 6:** Secuencias de los primers específicos utilizados en la PCR en tiempo real. Código IUB: A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timidina. Tm: temperatura de fusión.

Los resultados de la cuantificación relativa muestran que el tratamiento con hCG de fragmentos testiculares durante 4 horas aumenta la expresión del ARNm de StAR de una manera significativamente diferente al aumento en la expresión provocado por 8-Br-AMPc, en las mismas condiciones experimentales (Figura 35).



**Figura 35:** Cambios en la expresión del ARNm de StAR dados por los tratamientos con dos estimuladores de la esteroidogénesis con respecto al control sin tratamiento. Cada barra representa la media de la expresión normalizada a la expresión de GAPDH  $\pm$  EE, para un  $n=5$ .

Los resultados mostrados en el Capítulo 2 de esta tesis sugirieron que ni los GC ni hCG como tampoco 8-Br-AMPc afectan la cantidad de StAR aunque todos ellos sí afectaron la biosíntesis de andrógenos.

Por otra parte, la información existente en la bibliografía acerca de la proteína StAR y su regulación en anfibios es muy escasa. Esto sugirió realizar la caracterización molecular de la proteína y determinar si alguno de los reguladores de la esteroidogénesis afectaba su expresión. Para ello, se secuenció el ARNm de StAR de *R. arenarum*, obteniendo la secuencia completa de la zona codificante, de la que se dedujo la secuencia putativa de aminoácidos de la proteína y las secuencias parciales de las regiones 5' no codificantes y 3' no codificantes.

Varias de las secuencias de ARNm de StAR de anfibios analizadas previamente fueron publicadas en distintos trabajos (Bauer y col., 2000; Maruo y col., 2008; Kim y col., 2009) aunque ninguno de ellos fue realizado en una especie de la familia

Bufonidae. La comparación de la estructura primaria de StAR entre *R. arenarum* y las otras especies de vertebrados reflejó un alto porcentaje de conservación, particularmente en los dominios vinculados con la funcionalidad de la proteína, descriptos para StAR de humanos (Arakane y col., 1996; Wang y col., 1998). Dentro de estos dominios se encuentran las dos posibles secuencias consenso para la fosforilación por PKA (Arakane y col., 1997), que no muestran cambios en la mayoría de las especies comparadas ni en *R. arenarum*. También se encontraron allí, fuertemente conservados, los residuos que contribuyen a la formación de la estructura de túnel hidrofóbico para el transporte de lípidos (Tsujishita y Hurley, 2000) y los aminoácidos en los cuales una mutación puntual produce en humanos la enfermedad CLAH, ya mencionada.

Los alineamientos y el análisis de identidad y similitud de secuencias aminoacídicas ofrecen mucha información acerca de la conservación de dominios proteicos, estructuras y la función asociada a la misma. El conocimiento de estos sitios y su conservación en distintas especies nos permiten evaluar la posible importancia para el mantenimiento o el surgimiento de una función. También, la caracterización de estos dominios permite entender más a otras proteínas cuyas funciones pueden ser similares. Por ejemplo, la proteína MLN64 comparte un dominio homólogo a StAR y también estimula la esteroidogénesis (Watari y col., 1997).

Los alineamientos son la base sobre las que se realizan los análisis filogenéticos. Dado que dichos análisis son muy sensibles a estos alineamientos, en este trabajo se utilizaron y compararon dos alineaciones diferentes que utilizan distintos algoritmos (Clustal y MUSCLE). Los resultados de los análisis filogenéticos obtenidos en esta tesis utilizando como carácter la secuencia de StAR concuerdan con las relaciones filogenéticas obtenidas en peces al utilizar la secuencia de la misma proteína (Kusakabe y col., 2009; Sreenivasulu y col., 2009; Evans y Nunez, 2010).

En cuanto a la inducción de la expresión de StAR por hormonas tróficas, en testículos de anfibios sólo hay un trabajo (*in vivo*) en *L. catesbeianus*, en el cual se muestra que los niveles del ARNm de StAR aumentan a las 2 y las 4 horas post inyección de hCG (Paden y col., 2010). En este capítulo se mostró que el tratamiento *in vitro* con dosis de hCG que estimulan la síntesis de esteroides también produce un aumento del ARNm de StAR, aumento que no fue significativo cuando se midió la proteína en las mismas condiciones experimentales, lo cual podría avalar la especulación hecha en cuanto a la falta de sensibilidad de la técnica de Western blot.

En el pez *M. undulatus*, un perciforme, estudios *in vitro* mostraron que tratamientos de testículos con hCG durante 6 y 24 horas fueron insuficientes para afectar el nivel del mensajero de StAR, aunque si incrementaron la cantidad en folículos ováricos luego de 24 horas de incubación (Nunez y Evans, 2007). En el pez teleósteo *Clarias gariepinus*, se determinó la presencia del ARNm de StAR en el testículo, y este mensajero aumentó significativamente durante el periodo o fase preparatoria de su ciclo reproductivo. En hembras de la misma especie se realizaron también ensayos *in vivo* e *in vitro* con hCG, los que dieron como resultado el aumento de la expresión del mensajero de StAR, en oocitos maduros, entre las 2 y 4 horas post tratamiento (Sreenivasulu y col., 2009).

Los resultados de este capítulo permitieron mostrar, por primera vez en testículo de anfibios, lo que ocurre con los niveles del ARNm de StAR cuando se estimula directamente la actividad de la PKA con 8-Br-AMPc. Los resultados coinciden con los obtenidos para la expresión de la proteína StAR en el Capítulo 2. Si bien la activación de PKA puede aumentar la síntesis de esteroides de manera semejante a como lo hace hCG (Figura 19 y 21 del Capítulo 2 de esta tesis), el incremento en la expresión del mensajero de StAR es menor que aquel obtenido con hCG. Un resultado semejante fue obtenido en *O. mykiss*, aunque no en testículo sino en interrenal. En esta especie la estimulación *in vitro* con dibutilil-AMPc de glándulas interrenales durante 6 o 18 horas provocó un aumento significativo en la síntesis de cortisol con respecto al control, aunque no se observaron cambios en la expresión del ARNm de StAR (Hagen y col., 2006). Resultados similares se obtuvieron con ACTH, aunque con esta última los autores lograron aumentar levemente la expresión de StAR. En esta misma especie ya se había mostrado que situaciones de estrés incrementaban significativamente las concentraciones plasmáticas de cortisol y la cantidad de mensajero de StAR aún cuando inyecciones de ACTH no inducían cambios a nivel del mensajero, aunque la concentración de cortisol en plasma aumentaba significativamente (Geslin y Auperin, 2004).

Cuando se analizan todos estos trabajos se puede concluir que la proteína StAR se encuentra presente en tejidos esteroideogénicos de diversas especies y que su expresión parece estar relacionada con ciertos períodos reproductivos, en el caso de las gónadas, o con situaciones de estrés, en el caso de interrenales.

En *R. arenarum* la estimulación con hCG o con 8-Br-AMPc incrementa la síntesis de andrógenos de manera semejante pero hCG induce un cambio significativamente mayor en la expresión del ARNm de StAR que la activación de PKA, a diferencia de lo

que ocurre en mamíferos. Parecería ocurrir que hCG actúa utilizando vías de transducción de señales que no involucran a PKA dado que H89, un inhibidor de la quinasa, no modifica la respuesta a la gonadotrofina (Figura 8 del Capítulo 2 de esta tesis). En células de Leydig de ratón ya se describieron distintas vías de regulación de la esteroidogénesis independientes de AMPc (Stocco y col., 2005; Manna y col., 2006).

Todo lo mencionado hasta aquí señala por lo menos dos aspectos que se deben tener en cuenta. Uno de ellos es que no siempre los modelos propuestos para mamíferos pueden ser extrapolados a otros grupos filogenéticos. El modelo actual, sugerido para la regulación aguda de la síntesis de andrógenos, indica que para que se produzca un incremento en su producción es necesario que el colesterol sea transportado desde las gotas lipídicas localizadas en el citoplasma a la membrana interna mitocondrial. En dicha membrana se encuentra la primera enzima de la síntesis de esteroides, el Cyp450scc. Además, que a pesar de la aceptación general de esta propuesta aún existen varios puntos oscuros en el proceso, tal como lo planteara Miller recientemente en su revisión "Steroidogenesis: unanswered questions" (2017).

## VI Conclusiones

## Conclusiones

Al principio de esta tesis se plantearon distintas hipótesis relativas al control de la espermiación y la esteroidogénesis, teniendo en cuenta los trabajos previos realizados en *R. arenarum* como también en vertebrados en general y, en particular, en otros anfibios. Estas hipótesis se pusieron a prueba a lo largo de esta tesis y a continuación se enumera cuáles de ellas fueron aceptadas y cuáles rechazadas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

1. La espermiación estimulada por hCG involucra la acción no canónica de la NKA.

La participación de la NAK en el proceso de espermiación estimulado por hCG se puso en evidencia al inhibir la espermiación por el agregado de un CTS como la ouabaína. La particularidad de este compuesto es que puede modificar tanto la función del transporte de iones de la bomba como también activar una cascada de señalización intracelular vinculada a la función como receptor de la NKA. La inhibición específica del transporte de iones por el agregado de ortovanadato no alteró el resultado de la espermiación estimulada por hCG poniendo en evidencia que la función de la NAK que participa en el proceso es la no canónica, por lo que se acepta la hipótesis planteada.

2. La acción inhibitoria de ouabaína sobre la espermiación involucra la activación de PKC.

Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio que genera la ouabaína sobre la espermiación estimulada por hCG, y sabiendo que tratamientos con un estimulador de PKC también disminuyen el efecto de la gonadotrofina, se propuso que el rol de la ouabaína podría estar mediado por la activación de la mencionada quinasa. Es por esto que se evaluó en qué medida el efecto del CTS podía ser modificado por la presencia de inhibidores de amplio espectro de PKC. El efecto de ouabaína no se afectó por ninguno de los dos inhibidores usados, por lo que se rechaza la hipótesis planteada.

3. El mecanismo de acción de FSHrh para estimular la espermiación y la esteroidogénesis es similar al de hCG.

FHSrh estimula ambos procesos mencionados y trabajos previos del laboratorio mostraron que actúa sobre las células de Sertoli generando un aumento de AMPc. Por otra parte, hCG puede estimular ambos procesos estudiados y sólo el de espermiación es inhibido ante la presencia de un inhibidor de la PKA. La inhibición de la espermiación estimulada por FSHrh por un inhibidor de PKA y la falta de efecto sobre la esteroidogénesis son resultados similares a los obtenidos con hCG en las mismas condiciones experimentales, por lo cual se acepta la hipótesis.

4. Los glucocorticoides disminuyen la síntesis de andrógenos al inhibir la expresión de la proteína StAR.

El tratamiento con 150 nM de corticosterona, concentración plasmática correspondiente al período reproductivo de *R. arenarum*, genera una disminución de la secreción basal y estimulada de andrógenos, en testículos de animales que se encuentran en período no reproductivo, asociado a alta producción de andrógenos. En mamíferos, el aumento en la producción de testosterona se correlaciona con un aumento en la expresión de la proteína StAR. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que, independientemente del tratamiento realizado, la síntesis de StAR no se modifica de manera significativa y, particularmente, no correlaciona con la disminución de la síntesis de andrógenos resultante de los tratamientos con corticosterona. Debido a esto se rechaza la hipótesis.

5. La enzima 11 $\beta$ -HSD inhibe la acción de los glucocorticoides.

Luego de inhibir a la enzima 11 $\beta$ -HSD, el efecto negativo de los glucocorticoides sobre la síntesis de andrógenos se detectó con una dosis que en ausencia del inhibidor no afecta la producción de esteroides. Esto muestra que la actividad de la enzima modula el efecto de corticosterona en el testículo, por lo cual se acepta la hipótesis.

6. Tanto hCG como 8-Br-AMPc estimulan la síntesis de andrógenos al aumentar la síntesis de la proteína StAR.

Tratamientos en distintas condiciones experimentales con hCG y 8-Br-AMPc estimularon significativamente la síntesis de andrógenos pero no se observó un aumento de la cantidad de la proteína StAR, por esto se rechaza la hipótesis.

7. La secuencia de la proteína StAR en *R. arenarum* está altamente conservada en comparación con las de otros vertebrados.

La alineación de la secuencia aminoacídica de StAR de *R. arenarum* con las de distintos vertebrados mostró que tenía altos porcentajes de identidad y de similitud. Además, se observó que la secuencia conservaba los dominios vinculados a la funcionalidad de la proteína, definidos en mamíferos como el dominio de unión al colesterol, el de fosforilación por PKA y el de direccionamiento mitocondrial. Además, los árboles filogenéticos contruidos a partir de dichas alineaciones reflejan fidedignamente, en su mayoría, las relaciones filogenéticas establecidas para los distintos grupos de vertebrados con respecto a los nodos formados según la clase taxonómica de las especies utilizadas. Por todo esto se acepta la hipótesis.

8. Tanto hCG como 8-Br-AMPC estimulan la expresión del ARNm de StAR.

El análisis de la expresión del ARNm de StAR luego del tratamiento con ambos reguladores de la esteroidogénesis mostró que hCG induce un aumento significativamente mayor que 8-Br-AMPC, el que también incrementa a la proteína, por lo que se acepta la hipótesis.

Los resultados expuestos en esta tesis sostienen la hipótesis general de trabajo y se puede postular que en los machos de *R. arenarum* hCG tiene dos mecanismos de acción diferentes, uno que involucra a la NKA y la activación de la PKA, responsable de la espermiación, y otro, independiente de la bomba, que no involucraría la acción de dicha quinasa. Considerando los trabajos previos realizados en *R. arenarum*, así como lo observado en esta tesis, puede concluirse que la esteroidogénesis testicular puede ser estimulada por distintas cascadas de señalización y que la activada por hCG involucra la expresión del ARNm de StAR pero no la activación de la PKA, como se describe en mamíferos, por lo menos en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis.

El hecho de que el tratamiento con un análogo de AMPc estimule la síntesis de andrógenos en la misma magnitud que hCG, sumado a que la gonadotrofina actúa por una vía que no involucra a la PKA, puede tener varias explicaciones. Una de ellas es que existan otros compuestos que activen la síntesis de esteroides y que tengan una vía de señalización que involucre la activación de la quinasa, como el d-aspartato, por ejemplo,

que es un buen estimulador de la síntesis de esteroides en *P. esculentus* (Di Fiore y col., 2016). Otra posibilidad es que la hCG, considerada análoga funcional de la LH humana en lo que respecta a la regulación de la esteroidogénesis, pueda estimular la producción de andrógenos pero no necesariamente activando las mismas cascadas de señalización que la LH de *R. arenarum*. Así, podría ser que la gonadotropina homóloga sí fuera capaz de activar a la PKA junto con otras vías de señalización. Volonteri y col. (2013) realizaron la caracterización molecular de la subunidad  $\beta$  de LH de *R. arenarum* y establecieron que dicha subunidad, que le confiere especificidad a la actividad biológica, comparte sólo un 44% de identidad con la subunidad  $\beta$  de la LH humana. Sumado a esto, la subunidad  $\beta$  de hCG difiere estructuralmente de la propia LH, ya que tiene 24 aminoácidos más en el extremo C-terminal (Nwabuobi y col., 2017). Todo esto permite pensar que pueden tener mecanismos de acción diferentes.

Por otra parte, el aumento agudo en la producción de esteroides estimulado por gonadotropinas en ausencia de cambios en valores del ARNm o la proteína StAR, fue descrito hace varios años en la rata (Ariyoshi y col., 1998). En ese trabajo se sugirió que la regulación transcripcional y transduccional de StAR podía no estar involucrada en la estimulación aguda. En su trabajo Ariyoshi y col. (1998) también sugirieron que es posible que la redistribución de StAR en lugar de su síntesis neta fuera crítica para la esteroidogénesis. Esto podría explicar por qué la activación de PKA produce un aumento importante de la esteroidogénesis y una baja estimulación de la expresión del ARNm de StAR.

Lo que llamó la atención es que ninguno de los estimuladores de la síntesis de esteroides fuera capaz de modificar la cantidad de la proteína StAR mitocondrial. Esto llevó a estudiar la expresión del ARNm con el objeto de determinar si los resultados negativos se debían a problemas de sensibilidad de la técnica o de especificidad del anticuerpo utilizado. ¿Por qué se piensa en problemas de especificidad del anticuerpo? En su trabajo original Burrone y col. (2012) en *P. esculentus* lograron realizar inmunohistoquímicas con el anticuerpo que se utilizó en esta tesis, en tanto que todos los intentos llevados a cabo en *R. arenarum* resultaron infructuosos, independientemente de las modificaciones realizadas a la técnica.

En la secuenciación del ARNm de StAR no se consiguió obtener de forma completa la región 3' no codificante. La dificultad encontrada en la secuenciación del extremo 3' del

mensajero en *R. arenarum* permitió la secuenciación de la sección codificante que aporta mucha información en cuanto a la estructura proteica.

Para sacar conclusiones más profundas y responder interrogantes que quedaron planteados durante este trabajo se requerirían muchos estudios complementarios. Entre ellos:

Desarrollar anticuerpos homólogos para la proteína StAR y repetir los ensayos realizados a fin de descartar los problemas de especificidad o sensibilidad planteados.

Realizar experimentos con otros compuestos reguladores de la esteroidogénesis en anfibios como d-aspartato y determinar la participación de quinasas en dicha regulación, particularmente de la PKA.

Realizar mediciones del ARNm de StAR en experimentos *in vitro* en distintas condiciones experimentales. En particular, para determinar si la tendencia al aumento de la proteína observado luego del tratamiento con corticosterona está asociado a un aumento significativo del ARNm de StAR, tal lo ocurrido con hCG.

Realizar experimentos *in vitro* con bufoadienólidos, particularmente aquellos producidos por *R. arenarum* para determinar si tienen efecto sobre la espermiación.

Y, lo más improbable, utilizar para todos los ensayos las gonadotrofinas homólogas.

## VII Bibliografía

## Bibliografía

- Abé SI, Ji ZS. 1994. Initiation and stimulation of spermatogenesis in vitro by mammalian follicle-stimulating hormone in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 201-208.
- Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC. 1989. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264, 939-943.
- Agarwal AK, Mune T, Monder C, White PC. 1994. NAD<sup>+</sup> dependent isoform of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization cDNA for sheep kidney. *J. Biol. Chem.* 269, 959-962.
- Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. 2001. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 13420-13424.
- Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. 1994. Cloning and tissue distribution of the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molec. Cell. Endocrinol.* 105, R11-R17.
- Álvaro S. 2014. <https://www.researchgate.net/publication/282606537>. Análisis de secuencias biológicas.
- Amphibiaweb. 2018. <https://amphibiaweb.org/taxonomy/index.html>. University of California, Berkeley, CA, USA.
- Antila E, Saure A. 1978. Seasonal variation of androgen interconversion in testicular tissue of *Rana temporaria* in vitro. *Experientia.* 35, 326-328.
- Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF. 1997. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 32656-32662.
- Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Z, Holt JA, Pain D, Stocco DM, Miller WL, Strauss JF. 1996. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 13731-13736.
- Ariyoshi N, Kim YC, Artemenko I, Bhattacharya KK, Jefcoate CR. 1998. Characterization of the rat StAR gene that encodes the predominant 3.5 kb mRNA: ACTH stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of StAR mRNA and protein. *J. Biol. Chem.* 273, 7610-7619.
- Arriza JW, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA:

- structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237, 268-275.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stonkinger H. 2012. ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal. *Nucleic Acids Res.* 40, W597-W603.
- Bambino T, Hsueh A. 1981. Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 108, 2142-2148.
- Bauer MP, Bridgham JT, Langenau DM, Johnson AL, Goetz FW. 2000. Conservation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein structure and expression in vertebrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 168, 119-125.
- Beaumont K, Fanestil DD. 1983. Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology* 113, 2043-2051.
- Beguin P, Hasler U, Beggah A, Horisberger JD, Geering K. 1998. Membrane integration of Na,KATPase  $\alpha$ -subunits and  $\beta$ -subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 273, 24921-24931.
- Bertorello AM, Aperia A, Ivar Walaas S, Nairn AC, Greengard P. 1991. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 11359-11362.
- Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers. Distrib.* 9, 123-140.
- Blaustein MP. 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 264, 1367-1387.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* 4, 1633-1649.
- Borski RJ. 2000. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 427-436.
- Bose HS, Sato S, Aisenberg J, Shalev SA, Matsuo N, Miller WL. 2000. Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipid adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3636-3639.
- Brem AS, Matheson KL, Barnes JL, Morris DJ. 1991. 11-Dehydrocorticosterone, a

- glucocorticoid metabolite, inhibits aldosterone action in toad bladder. *Am. J. Physiol.* 261, F873-F879.
- Brem AS, Matheson KL, Conca T, Morris DJ. 1989. Effect of carbenoxolone on glucocorticoid metabolism and Na transport in toad bladder. *Am. J. Physiol.* 257, F700-F704
- Brem AS, Matheson KL, Latif S, Morris DJ. 1993. Activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in toad bladder: effects of 11-dehydrocorticosterone. *Am. J. Physiol.* 264, F854-F858.
- Breuner CW, Orchinik M. 2009. Pharmacological characterization of intracellular, membrane, and plasma binding sites for corticosterone in house sparrows. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 214-224.
- Breuner CW, Patterson SH, Hahn TP. 2008. In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 288-295.
- Brown RW, Chapman KE, Edwards CRW, Seckl JR. 1993. Human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: partial purification of and evidence for a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology.* 132, 2614-2621.
- Burgos MH, Mancini RE. 1948. Ciclo espermatogénico anual del *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 24, 328-336.
- Burgos MH, Vitale-Calpe RE. 1967. The mechanism of spermiation in the toad. *Am. J. Anat.* 120, 227-252.
- Burrone L, Raucci F, Di Fiore MM. 2012. Steroidogenic gene expression following D-aspartate treatment in frog testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 109-117.
- Bygdeman M, Swahn ML, Gemzell-Danielsson K, Svalander P. 1993. Mode of action of RU 486. *Ann. Med.* 25, 61-64.
- Callard IP, Callard GV, Lance V, Bolaffi JL, Rosset JS. 1978. Testicular regulation in non-mammalian vertebrates. *Biol. Reprod.* 18, 16-43.
- Canosa LF, Ceballos NR. 2002a. *In vitro* hCG and human recombinant FSH actions on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 318-324.
- Canosa LF, Ceballos NR. 2002b. Seasonal changes in testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H. *Gen Comp Endocrinol.* 125, 426-434.
- Canosa LF, Pozzi AG, Ceballos NR. 1998. Pregnenolone and progesterone metabolism by testes of *Bufo arenarum*. *J. Comp. Physiol. B* 168, 491-496.
- Canosa LF, Pozzi AG, Rosembliit C, Ceballos N.R. 2003. Steroid production in toads. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 227-233.

- Canosa LF, Pozzi AG, Somoza GM, Ceballos NR. 2002. Effects of mammalian GnRH on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. Gen. Comp. Endocrinol. 127, 174-180.
- Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. 1997. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 11540-11545.
- Ceballos NR, Cozza EN, Lantos CP. 1983. Corticoidogenesis in *Bufo arenarum* H. I. In vitro biosynthesis of <sup>3</sup>H-pregnenolone and <sup>3</sup>H-corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28 C and 37 C. Gen. Comp. Endocrinol. 51, 138-147.
- Chand D y Lovejoy DA. 2011. Stress and reproduction: Controversies and challenges. Gen. Comp. Endocrinol. 171, 253-257.
- Chen X, Baker BY, Abduljabbar MA, Miller WL. 2005. A genetic isolate of congenital lipid adrenal hyperplasia with atypical clinical findings. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 835-840.
- Chester-Jones I, Phillips JG, Holmes WN. 1959. Comparative Physiology of the adrenal cortex. In: "Comparative Endocrinology". (A. Gorbman, ed.), Wiley, New York.
- Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. 1995. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Molec. Endocrinol. 9, 1346-1355.
- Clark BJ, Wells J, King, SR, Stocco DM. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. J. Biol. Chem. 269, 28314-28322.
- Clark BJ. 2012. The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. J. Endocrinol. 212, 257-275.
- Claros MG, Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Eur. J. Biochem. 241, 770-786.
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. 2017. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. Front. Physiol. 8, 1-16.
- Colombe L, Fostier A, Bury N, Pakdel F, Guiguen Y. 2000. A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Cloning and characterization of its steroid binding domain. Steroids. 65, 319-328.

- Contreras RG, Flores-Maldonado C, Lázaro A, Shoshani L, Flores-Benitez D, Larré I, Cereijido M. 2004. Ouabain binding to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase relaxes cell attachment and sends a specific signal (NACos) to the nucleus. *J. Membr. Biol.* 198, 147-58.
- Cooke BA, Abayasekara DRE, Choi MSK, Dirami G, Phipp LH, West AP. 1992. The effects of stress-induced ligands on testosterone formation in Leydig cells. En: Sheppard KE, Boublik JH, Funder JW, (eds.) *Stress and Reproduction*. New York: Raven Press. 135-144.
- Cooke BA. 1999. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol* 151, 25-35.
- Crabbé J. 1961. Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. *Endocrinology*. 69, 673-682.
- Crespi EJ, Denver RJ. 2004. Ontogeny of corticotropin-releasing factor effects on locomotion and foraging in the Western spadefoot toad (*Spea hammondi*). *Horm. Behav.* 46, 399-410.
- Csikos T, Tay J, Danielsen M. 1995 Expression of the *Xenopus laevis* mineralocorticoid receptor during metamorphosis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 50:393-396.
- Cui X, Xie Z. 2017. Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. *Molecules*. 22, 990-1009.
- Cumming D, Quigley ME, Yen SCC. 1983. Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *Endocrinology*. 57, 671-673.
- Czuchlej SC, Volonteri MC, Regueira E, Ceballos NR. 2018. Effect of glucocorticoids on androgen biosynthesis in the testes of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Exp. Zool.* 1, 10. DOI 10.1002/jez.2232.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 27, 1164-1165.
- de Kloet ER. 1993. Function of steroid receptor systems in the central nervous system. *Clin. Neuropharmacol.* 7, 272-280.
- De Robertis EDP, Burgos MH, Breyer E. 1945. Acción de la hipófisis sobre la célula de Sertoli y el proceo de expulsión de los espermatozoides en los anfibios. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 4, 21-25.
- Denari D, Ceballos NR. 2005. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Bufo arenarum*. Changes in its seasonal activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 113-120.
- Denari D, Ceballos NR. 2006. Cytosolic glucocorticoid receptor in the testis of *Bufo*

- arenarum*. Seasonal changes in its binding parameters. Gen. Comp. Endocrinol. 147, 247-254.
- Deviche P, Breuner C, Orchinik M. 2001 Testosterone, corticosterone, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 122, 67-77.
- Di Fiore MM, Santillo A, Baccari GC. 2014. Current knowledge of d-aspartate in glandular tissues. Amino Acids. 46, 1805-1818.
- Di Fiore MM, Santillo A, Falvo S, Longobardi S, Chieffi-Baccari G. 2016. Molecular mechanism elicited by d-aspartate in Leydig cells and spermatogonia. Int. J. Mol. Sci. 17, 1127-1137.
- Dickens MJ, Romero M. 2013. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. Gen. Comp. Endocrinol. 191, 177-189.
- Dmitrieva RI, Doris PA. 2003. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. J. Biol. Chem. 278, 28160-2866.
- Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress and how does it affect reproduction? Ann. Reprod. Sci. 60, 749-752.
- Dong Q, Salva A, Sottas CM, Niu E, Holmes M, Hardy MP. 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. J. Androl. 25, 973-981.
- Duellman WE, Trueb L. 1994. Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York.
- Echeverría DD. 1987. Desarrollo del testículo en *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). Ciclos espermatogénicos y variaciones estacionales en los sapos juveniles. Rev Mus Arg Cs Nat. 9, 125-138.
- Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C. 1988. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase—tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. Lancet. 2, 986-989.
- Evain D, Morera AM, Saez JM. 1976. Glucocorticoid receptors in interstitial cells of the rat testis. J. Steroid Biochem. 7, 1135-1139.
- Evans AN, Nunez BS. 2010. Regulation of mRNAs encoding the steroidogenic acute regulatory protein and cholesterol side-chain cleavage enzyme in the elasmobranch interrenal gland. Gen. Comp. Endocrinol. 168, 121-132.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988, 889-895.
- Evans SJ, Murray TF, Moore FL. 2000. Partial purification and biochemical

- characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* 72, 209-221.
- Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG. 2010. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *J. Neuroendocrinol.* 22, 846-861.
- Farkash Y, Timberg R, Orly J. 1986. Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology.* 118, 1353-1365.
- Fasano S, Minucci S, Di Matteo L, D'Antonio M, Pierantoni R. 1989. Intratesticular feedback mechanisms in the regulation of steroid profiles in the frog, *Rana esculenta*. *Gen Comp Endocrinol.* 75, 335-342.
- Fernández Solari JJ, Pozzi AG, Ceballos NR. 2002. Seasonal changes in the activity of cytochrome P450c17 from the testis of *Bufo arenarum*. *J Comp Physiol.* 172, 685-690.
- Fleming AK, Storz P. 2017. Protein kinase C isoforms in the normal pancreas and in pancreatic disease. *Cell. Signal.* 40, 1-9.
- Flück CE, Maret A, Mallet D, Portrat-Doyen S, Achermann JC, Leheup B, Theintz GE, Mullis PE, Morel Y. 2005. A novel mutation L260P of the steroidogenic acute regulatory protein gene in three unrelated patients of Swiss ancestry with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5304-5308.
- Frost DR. 2011. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31/01/2011). Available in <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, Nueva York, EEUU>.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. 1988. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242, 583-585.
- Funder JW. 1989. How can aldosterone act as a mineralocorticoid?. *Endocr. Res.* 15, 227-238.
- Fustinoni O, Porto J. 1938. Morfología de las glándulas adrenales del sapo *Bufo arenarum* (Hensel). *Rev. Soc. Arg. Biol.* 14, 315-320.
- Gable ME, Abdallah SL, Najjar SM, Liu L, Askari A. 2014. Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: On the relation of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 1151-1154.
- Gallardo JM. 1965. Especiación en tres *Bufo* neotropicales (Amphibia, Anura). *Papeis Avulsos do Dpto. Zool.* 17, 57-75.

- Gallardo JM. 1974. Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina.
- Gao H-B, Shan L-X, Monder C, Hardy MP. 1996. Suppression of endogenous corticosterone levels *in vivo* increases the steroidogenesis capacity of purified rat Leydig cells *in vitro*. *Endocrinology*. 137, 1714-1418.
- Gao H-B, Tong M-H, Hu Y-Q, Guo Q-S, Ge R-S, Hardy MP. 2002. Glucocorticoid induces apoptosis in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 143, 130-138.
- Gao, H-B., Ge, R-S., Lakshmi, V., Marandici, A., Hardy, M.P. 1997. Hormonal regulation of oxidative and reductive activities of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 138, 156-161.
- Gasser PJ, Orchinik M. 2000. Membrane receptors for glucocorticoids. En: Cox T, de Kloet E, McEwen B, Rose N, Rothwell N, Rubin R, Steptoe A, Swanson L, Fink G, (eds.). *Encyclopedia of stress*. San Diego: Academic Press, vol. 2.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: John M. Walker (ed.): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.
- Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, Weizman A. 1999. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* 51, 629-650.
- Ge RS, Hardy MP. 2000. Initial predominance of the oxidative activity of type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase in primary rat Leydig cells and transfected cell lines. *J.Androl.* 21, 303-310.
- Geering K. 1991. The functional role of the  $\beta$ -subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* 285,189-193.
- Gentz EJ. 2007. Medicine and surgery of amphibians, *ILAR J.* 48, 255-259.
- Geslin M, Auperin B. 2004. Relationship between changes in mRNAs of the genes encoding steroidogenic acute regulatory protein and P450 cholesterol side chain cleavage in head kidney and plasma levels of cortisol in response to different kinds of acute stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 70-80.
- Ghosh AK, Ghosh D, Ghosh PK, Biswas NM. 1990. Influence of pituitary on histology of Bidder's organ in castrated toad *Bufo melanostictus*. *Indian J. Exp. Biol.* 28, 790-791.

- Gorbman A, Dickhoff WW, Vigna SR, Clark NB, Ralph CL. 1983. The adrenal cortex and interrenal gland. En: Gorbman A, Dickhoff WW, Vigna SR, Clark NB, Ralph CL, (eds.). Comparative endocrinology. USA: John Wiley & Sons, ed. 1, 415-450
- Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. 2002. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and the EGF receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 277, 18694-18702.
- Hadfield CA, Clayton LA, Barnett SL. 2006. Nutritional Support of Amphibians. J. Exotic Pet Med. 15, 255-263.
- Hagen IJ, Kusakabe M, Young G. 2006. Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 $\beta$ -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production. Gen. Comp. Endocrinol. 145, 254-262.
- Hales DB, Payne AH. 1989. Glucocorticoid-mediated repression of P450<sub>scc</sub> mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. Endocrinology. 124, 2099-2104.
- Hall PF. 1994. Chapter 21: Testicular steroid synthesis: organization and regulation. En: Knobil E., Neill J. (eds.), The Physiology of Reproduction, vol I, pp. 1335-1362, Nueva York, Raven Press.
- Hanaoka Y, Hayashi H, Takahashi H. 1984. Isolation and characterization of bullfrog gonadotropins. Gunma Symp. Endocrinol. 21, 63-77.
- Hardy MP, Ganjam VK. 1997. Stress, 11 $\beta$ -HSD, and Leydig cell function. J. Androl. 18, 475-479.
- Hardy MP, Gao H-B, Dong Q, Ge R-S, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. 2005. Stress hormone and male reproductive function. Cell Tissue Res. 322, 147-153.
- Hasler U, Wang X, Crambert G, Beguin P, Jaisser F, 1998. Role of  $\beta$ -subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. 273, 30826-30835.
- Hayashi H, Hayashi T, Hanaoka Y. 1992a. Amphibian lutropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete amino acid sequence of the  $\beta$  subunit. Eur J Biochem. 205,105-110.
- Hayashi T, Hanaoka Y, Hayashi H. 1992b. The complete amino acid sequence of the follitropin beta-subunit of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Gen Comp Endocrinol. 88:144-150.
- Haynes RC, Koritz SB, Peron FG. 1959. Influence of adenosine 3',5'-monophosphate on corticoid production by rat adrenal glands. J. Biol. Chem. 234, 1421-1423.

- Henikoff S, Henikoff JG. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10915-10919.
- Hu G-X, Lianc Q-Q, Linb H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Ge RS. 2008. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids.* 73, 1018-1024.
- Huang H, Cai L, Remo BF, Brown DD. 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7348-7353.
- Huang T-J, Li PS. 2001. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biol. Reprod.* 64, 163-170.
- Huang XY, Madan A. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program, *Genome Res.* 9, 868-877.
- Huang YY, Zhang L. 2003. Rapid and sensitive dot-matrix methods for genome analysis. *Bioinformatics.* 20, 460-466.
- Ing NH, Forrest DW, Riggs PK, Loux S, Love CC, Brinsko SP, Varner DD, Welsh Jr TH. 2014. Dexamethasone acutely down-regulates genes involved in steroidogenesis in stallion testes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 143, 451-459.
- Ishii S, Itoh M. 1992. Amplexus induces surge of luteinizing hormone in male toads, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 34-41.
- Itoh M, Inoue M, Ishii S. 1990. Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 78, 242-253.
- Itoh M, Ishii S. 1990. Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behavior during the breeding season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80, 451-464.
- Jefcoate CR, DiBartolomeis MJ, Williams CA, McNamara BC. 1987. ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J. Steroid Biochem.* 27, 721-729.
- Jefcoate CR, McNamara BC, DiBartolomeis MJ. 1986. Control of steroid synthesis in adrenal fasciculata cells. *Endocr. Res.* 12, 315-350.
- Jiang C-L, Liu L, Tasker JG. 2014. Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front. Neuroendocrinol.* 35, 72-75.
- Johnson AL, Solovieva EV, Bridgham JT. 2002. Relationship between steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in hen granulosa cells during follicle development. *Biol. Reprod.* 67, 1313-1320.

- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275-282.
- Karaboyas GC, Koritz SB. 1965. The transformation of delta-5-pregnenolone and progesterone to cortisol by rat adrenal slices and the effect of ACTH and adenosine 3'-5'-monophosphate upon it. *Biochemistry.* 100, 600-602.
- Kim LW, Im WB, Choi HH, Ishii S, Kwon HB. 1998. Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in *Rana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 13-23.
- Kim S-C, Oh S-D, Ahn R-S, Soh J, Kwon H-B. 2009. Molecular cloning and expression of steroidogenic acute regulatory protein from bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 146-152.
- Kime DE, Hews EA. 1978. Androgen biosynthesis *in vitro* by testes from Amphibia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35, 280-288.
- King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, Clark BJ, Orly J, Stocco DM. 1995. Steroid production after *in vitro* transcription, translation, and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology.* 136, 5165-76.
- Kobayashi T, Sakai N, Adachi S, Asahina K, Iwasawa H, Nagahama Y. 1993. 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one is the naturally occurring spermiation-inducing hormone in the testis of a frog, *Rana nigromaculata*. *Endocrinology.* 133, 321-327.
- Komoike Y, Ishii S. 2003. Cloning of cDNAs encoding the three pituitary glycoprotein hormone  $\beta$  subunit precursor molecules in the Japanese toad, *Bufo japonicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 132, 333-347.
- Krozowski ZS, Funder JW. 1983. Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 19, 6056-6060.
- Kusakabe M, Todo M, McQuillan HJ, Goetz FW, Young G. 2002. Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNA in trout. *Endocrinology.* 143, 2062-2070.
- Kusakabe M, Zuccarelli MD, Nakamura I, Young G. 2009. Steroidogenic acute regulatory protein in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): cDNA cloning, sites of expression and transcript abundance in corticosteroidogenic tissue after an acute stressor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 233-240.
- Lamotte M, Glacon R, Xavier F. 1973. Recherches sur le developpement embryonnaire de *Nectophrynoides occidentalis* amphibien Anoure vivipare. II. Le developpement

- des gonades. Ann. D'Embryol. Morphol. 6, 271-296.
- Lange CB, Hanke W, Morishige WK. 1989. Corticosteroid receptors in liver cytosol of the clawed toad, *Xenopus laevis*: influence of thyroid and ovarian hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 73, 485-497.
- Lange CB, Hanke W. 1988. Corticosteroid receptors in liver cytosol of the clawed toad, *Xenopus laevis*: daily and seasonal variations. Gen. Comp. Endocrinol. 71, 141-152.
- Laursen M, Gregersen JL, Yatimea L, Nissen P, Fedosova NU. 2015. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase compared with the ouabain-bound complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, 1755-1760.
- Leary CJ, Crocker-Buta S. 2018. Rapid effects of elevated stress hormones on male courtship signals suggest a major role for the acute stress response in intra- and intersexual selection. Funct. Ecol. 32, 1214-1226
- Levy FO, Ree AH, Eikvar L, Govindan MV, Jahnsen T, Hansson V. 1989. Glucocorticoid receptors and glucocorticoid effect in rat Sertoli cells. Endocrinology. 124, 430-436.
- Li Y-Y, Inoue K, Takei Y. 2003. Steroidogenic acute regulatory protein in eels: cDNA cloning and effects of ACTH and seawater transfer on its mRNA expression. Zool. Sci. 20, 211-219.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JFIII, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science. 267, 1828-1831.
- Lin H, Yuan K-M, Zhou H-Y, Bu T, Su H, Liu S, Zhu Q, Wang Y, Hu Y, Shan Y, Lian Q-Q, Wu X-Y, Ge R-S. 2014. Time-course changes of steroidogenic gene expression and steroidogenesis of rat Leydig cells after acute immobilization stress. Int. J. Mol. Sci. 15, 21028-21044.
- Lingrel JB, Kuntzweiler T. 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. J. Biol. Chem. 269, 19659-19662.
- Lingrel JB. 2010. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. Annu. Rev. Physiol. 72, 395-412.
- Liu AY-C, Bentley PJ. 1971. A comparison of the toxicity of ouabain in vivo and in vitro in the frog, *Rana pipiens*, and the toad, *Bufo marinus*. Comp. Gen. Pharmacol. 2, 476-478.
- Liu J, Periyasamy SM, Gunning W, Fedorova OV, Bagrov AY, Malhotra D, Xie Z, y Shapiro JI. 2002. Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells. Kidney Int. 62, 118-125.

- Liu L, Mohammadi K, Aynafshar B, Wang H, Li D, Liu J, Ivanov AV, Xie Z, y Askari A. 2003. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, 1550-1560.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods.* 25, 402-408.
- Lofts B. 1974. Reproduction, in: Lofts B., (ed.), *Physiology of the amphibian*. Academic Press, New York, pp. 107-218.
- Lofts B. 1987. Testicular function. En: *Hormones and reproduction in Fishes, Amphibians, and reptiles*. Norris D.O., Jones R.E. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 283-325.
- Maddison DR, Schulz K-S. (eds.).2007. The Tree of Life Web Project. Internet address: <http://tolweb.org>.
- Madelaire CB, Gomes FR. 2016. Breeding under unpredictable conditions: Annual variation in gonadal maturation, energetic reserves and plasma levels of androgens and corticosterone in anurans from the Brazilian semi-arid. *Gen. Comp. Endocrinol.* 228, 9-16.
- Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gross P, Levenson R. 1996. Identification of the mammalian Na,K-ATPase β-subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 22754-22758.
- Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM. 2006. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of STAR phosphorylation. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 81-95.
- Manna PR, Huhtaniemi IT, Stocco DM. 2004. Detection of hCG responsive expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig cells. *Biol. Proced. Online.* 6, 83-93.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, 222-226.
- Martin LJ, Tremblay JJ. 2008. Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NR4A1. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 65-75.
- Maruo K, Suda M, Yokoyama S, Oshima Y, Nakamura M. 2008. Steroidogenic gene expression during sex determination in the frog *Rana rugosa*. *Chemosphere.* 80, 41-45

- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66, 1121-1188.
- McEwen BS. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840, 33-44.
- Meister B, Fryckstedt J, Schalling M, Cortés R, Hökfelt T, Aperia A, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Ehrlich M, Greengard P. 1989. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) and dopamine DA1 agonist-sensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in renal tubule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8068-8072.
- Mercer WR, Krosowski ZS 1992 Localization of an 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity to the distal nephron. Evidence for the existence of two species of dehydrogenase in the rat kidney. *Endocrinology.* 130, 540-543.
- Miller WL. 2016 Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165, 18-37.
- Miller WL. 2017. Steroidogenesis: unanswered questions. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 771-793.
- Monder C, Hardy MP, Blanchard RJ, Blanchard DC. 1994b. Comparative aspects of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids.* 59, 69-73.
- Monder C, Lakshmi V, Miroff Y. 1991. Kinetic studies on rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1115:23-29.
- Monder C, Miroff Y, Marandici A, Hardy MP. 1994a. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 134, 1199-1204.
- Monder C, Sakai .R, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. 1994c. Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology.* 134, 1193-1198.
- Monder C, White PC. 1993. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 47, 187-271.
- Moore CD, Mellon SH, Murai J, Siiteri PK, Miller WL. 1993. Structure and function of the hepatic form of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistant. *Endocrinology.* 133, 368-375
- Moore IT, Jessop TS. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* 43, 39-47.

- Morris JF, Beigi FI, Butler VP, Gari I, Lichtstein D. 1997. Ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in toad brain. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 599-606.
- Müller CH, Licht P. 1980. Gonadotropin specificity of androgen secretion by amphibian testes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42, 365-377.
- Müller CH. 1977. *In vitro* stimulation of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and testosterone secretion from bullfrog testis by nonmammalian and mammalian gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33, 109-121.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25-44.
- Narayan EJ, Gramapurohit NP. 2016. Sexual dimorphism in baseline urinary corticosterone metabolites and their association with body-condition indices in a peri-urban population of the common Asian toad (*Duttaphrynus melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 191, 174-179.
- Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. 1995. Expression cloning of the aldosterone target cell-specific 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rabbit collecting duct cells. *Endocrinology.* 136, 2579-2586.
- Nunez BS, Evans AN. 2007. Hormonal regulation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in gonadal tissues of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 495-504.
- Nwabuobi C, Arlier S, Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Lockwood CJ, Kayisli UA. 2017. hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 217, 20-37.
- Ochiai H, Takeda K, Soeda S, Tahara Y, Takenaka H, Abe K, Hayashi Y, Noguchi S, Inoue M, Schwarz S, Schwarz W, Kawamura M. 2009. Epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by favoring the E1 conformation. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1069-1074.
- Orchinik M, Matthews L, Gasser PJ. 2000. Distinct specificity for corticosteroid binding sites in amphibian cytosol, neuronal membranes, and plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 284-301.
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL. 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* 252, 1848-1851.
- Orr TE, Mann DR. 1992. Role of glucocorticoid in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm. Behav.* 26, 350-363.
- Orr TE, Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC, Mann DR. 1994. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-liase without affecting the

- binding of LH/hCG. J. Androl. 15, 302-308.
- Paden NE, Carr JA, Kendall RJ, Wages M, Smith EE. 2010. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in male American bullfrog (*Rana catesbeiana*) and preliminary evaluation of the response to TNT. Chemosphere. 80, 41-45.
- Pancak-Roessler MK, Norris DO. 1991. The effect of orchidectomy and gonadotropins on steroidogenesis and oogenesis in Bidder's organ of the toad *Bufo woodhousii*. J. Exp. Zool. 260, 323-336.
- Paniagua R, Fraile B, Sáez FJ. 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. Histol. Histopath. 5, 365-378.
- Payne AH, Sha LL. 1991. Multiple mechanisms for regulation of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5 \rightarrow 4$ -isomerase,  $17\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. Endocrinology. 129 1429-1435
- Pedersen RC, Brownie AC. 1983. Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 1882-1886.
- Pedersen RC, Brownie AC. 1987. Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. Science. 236, 188-190.
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. Rev. Per. Biol. 18, 265-267.
- Perera Córdova WH, Leitaó SG, Cunha-Filho G, Bosch RA, Alonso IP, Pereda-Miranda R, Gervou R, Araújo Touza N, Quintas LE, Noel F. 2016. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity. Toxicon. 110, 27-34.
- Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. 1989. Corticosteroid  $11\beta$ -dehydrogenase in rat testis. Endocrinology 125, 209-216.
- Pierre SV, Xie Z. 2006. The  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase receptor complex. Cell Biochem. Biophys. 46, 303-315.
- Piezzi RS, Burgos MH. 1968. The toad adrenal gland. I. Cortical cells during summer and winter. Gen. Comp. Endocrinol. 10, 344-354.
- Pinelli C, Fiorentino M, D'Aniello B, Tanaka S, Rastogi RK. 1996. Immunohistochemical demonstration of FSH and LH in the pituitary of the developing frog, *Rana esculenta*. Gen. Comp. Endocrinol. 104, 189-196.

- Polzonetti-Magni A, Botte V, Bellini-Cardellini L, Gobetti A, Crasto A. 1984. Plasma sex hormones and post-reproductive period in the green frog, *Rana esculenta* complex. *Gen Comp Endocrinol.* 54, 372-377.
- Ponting CP, Aravind L. 1999. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 4, 130-132.
- Pozzi AG, Ceballos NR. 2000. Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 164-171.
- Pozzi AG, Fernandez Solari JJ, Ceballos NR 2001. Two populations cells with different responsiveness to mammalian LH, FSH and hCG from the testis of *Bufo arenarum*. *Perspect. Comp. Endocrinol.* 1, 1189-1194.
- Pozzi AG, Lantos CP, Ceballos NR. 1997. Subcellular localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid.dehydrogenase isomerase in testis of *Bufo arenarum* H. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 400-406.
- Pozzi AG, Lantos CP, Ceballos NR. 2002. Effect of salt acclimatisation on 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the interrenal of *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 68-74.
- Pozzi AG, Rosembliit C, Ceballos NR. 2006. Effect of human gonadotropins on spermiation and androgen biosynthesis in the testis of the toad *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305, 96-102.
- Pudney J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32, 459-497.
- Pudney J. 1998. Leydig and Sertoli cells. Nonmammalian. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E., Neill JD (eds.). Academic Press. Vol 2, 1008-1020.
- Rabin D, Gold PW, Margioris AN, Chrousos GP. 1988. Stress and reproduction: physiologic and pathophysiologic interactions between the stress and reproductive axis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 245, 377-387.
- Razani B, Woodman S E y Lisanti M P. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54, 431-467.
- Regueira E, Sassone A, Scaia MF, Volonteri MC, Ceballos NR. 2013b. Seasonal changes and regulation of the glucocorticoid receptor in the testis of the toad *Rhinella arenarum*. *J. Exp. Zool. Ecol. Genet. Physiol.* 319, 39-52.
- Regueira E, Scaia MF, Volonteri MC, Ceballos NR. 2013a. Anteroposterior variation of the cell types in the interrenal gland of the male toad of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Morphol.* 274, 331-343.

- Relyea RA, Mills N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2491-2496.
- Reul JM, Sutanto W, van Eekelen JA, Rothuizen J, de Kloet ER. 1990. Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 271, 243-256.
- Romero ML. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 1-24.
- Rosemblit C, Pozzi AG, Ceballos NR. 2006. Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus ocellatus*. *J. Comp. Physiol. B.* 176, 559-566.
- Rosner W. 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr. Rev.* 11, 80-91.
- Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Soder M, Berning B, Holsboer F, Damm K. 1993. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 247, 145-154.
- Russo J, Burgos MH. 1969. Effect of hCG on the enzymatic activity of toad testes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 185-188.
- Rusvai E, Naray-Fejes-Toth A. 1993. A new isoform of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10717-10720.
- Saito A, Kano Y, Suzuki M, Tomura H, Takeda J, Tanaka S. 2002. Sequence analysis and expressional regulation of messenger RNAs encoding  $\beta$  subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Biol. Reprod.* 66, 1299-1309.
- Santillo A., Falvo S., Di Fiore M., Chieffi Baccari G. 2017. Seasonal changes and sexual dimorphism in gene expression of StAR protein, steroidogenic enzymes and sex hormone receptors in the frog brain, *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 226-232.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid in primates. *J. Neurosci.* 10, 2897-2902.
- Sapolsky RM. 1985. Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids. *Endocrinology.* 116, 2273-2278.

- Saunders R, Scheiner-Bobis G. 2004. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur. J. Biochem.* 271, 1054-1062.
- Scaia M.F., Regueira E., Volonteri M.C., Ceballos N.R. 2013. Estradiol production by the Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Seasonal variations in plasma estradiol. *J. Exp. Zool.* 319A, 355-364.
- Scaia MF, Czuchlej C, Cervino NG, Ceballos NR. 2016. Apoptosis, proliferation and presence of estradiol receptors in the testes and Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Morphol.* 77, 412-423.
- Scaia MF, Regueira E, Sassone AG, Volonteri MC, Ceballos NR. 2011. The Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 15, 439-446.
- Scaia MF, Volonteri MC, Czuchlej C, Ceballos NR. 2015. Effect of estradiol on apoptosis, proliferation and steroidogenic enzymes in the testes the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *Gen. Comp. Endocrinol.* 221, 244-254.
- Scaia MF, Volonteri, MC, Czuchlej SC, Ceballos NR. 2018. Estradiol and reproduction in the South American toad *Rhinella arenarum* (Amphibian, Anura). *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.03.018>
- Scanzano R, Segall L, Blostein R. 2007. Specific Sites in the Cytoplasmic N Terminus Modulate Conformational Transitions of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 282, 33691-33697.
- Schmidt TJ, Husted RF, Stokes JB. 1993. Steroid hormone stimulation of Na<sup>+</sup> transport in A6 cells is mediated via glucocorticoid receptors. *Am. J. Physiol.* 264, C875-C884.
- Schultz R, Isola J, Parvinen M, Honkaniemi J, Wilkstrom AC, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M. 1993. Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 95, 115-120.
- Seckl JR, Brown RW. 1994. 11-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase: on several roads to hypertension. *J. Hypertens.* 12, 105-112
- Seckl JR, Walker BR. 2001. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1.A tissue specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology.* 142, 1371-1376.
- Seung-Chang K, Sung-Dug O, Ryun-Sup A, Jaemog S, Hyuk-Bang K. 2009. Molecular cloning and expression of steroidogenic acute regulatory protein from bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol* 162, 146-152.

- Sheppard KE. 1998. Decreased apparent affinity of corticosterone for colonic crypt glucocorticoid receptors is dependent on the cellular milieu and is distinct from corticosterone metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64, 35-42.
- Sreenivasulu G, Sridevi P, Sahoo PK, Swapna I, Ge W, Kirubakaran R, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B. 2009. Cloning and expression of StAR during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 154, 6-11.
- Stalker A, Hermo L, Antakly T. 1989. Covalent affinity labeling, radioautography, and immunocytochemistry localize the glucocorticoid receptor in rat testicular Leydig cells. *Am. J. Anat.* 186, 369-377.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. Principles and procedures of statistics. A biomedical approach. Chapter 9. New York. McGraw Hill.
- Stocco DM, Sodeman TC. 1991. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J. Biol. Chem.* 226, 19731-19738.
- Stocco DM, Wang XJ, Jo Y, Manna PR. 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19, 2647-2659.
- Stocco DM, Zhao AH, Tu LN, Morohaku K, Selvaraj V. 2017. A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 441, 7-16.
- Stocco DM. 2002. Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 19-25.
- Stone D, Hechter O. 1954. Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: The site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 51, 457-469.
- Takada K, Ishii S. 1984. Purification of bullfrog gonadotropin: presence of two subspecies of luteinizing hormone with high isoelectric points. *Zool. Sci.* 1, 617-629.
- Takada K, Kubokawa K, Ishii S. 1986. Specific gonadotropin binding sites in the bullfrog testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61, 302-312.
- Takahashi H, Hanaoka Y. 1985. Characterization of bullfrog gonadotropins molecules in comparison with mammalian hormones. En: Lofts, B., Holmes, W.H. (eds.), *Current Trends in Comparative Endocrinology*. Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 187-188.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D., Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L. 2006. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 17, 317-326.
- Townson DH, Wang XJ, Keyes PL, Kostyo JL, Stocco DM. Expression of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein in the Corpus Luteum of the Rabbit: Dependence upon the Luteotropic Hormone, Estradiol-17 $\beta$ . *Biol. Reprod.* 55, 868-874.
- Tsujishita Y, Hurley JH. 2000. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat. Struct. Biol.* 7, 408-414.
- Tuckey RC. 2005. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta.* 26, 276-281.
- Vahouny GV, Chanderbhan R, Kharroubi A, Noland BJ, Pastuszyn A, Scallen TJ. 1987. Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Adv. Lipid Res.* 22, 83-113.
- Vaira M, Akmentins M, Attademo M, Baldo D, Barrasso D, Barrionuevo S, Basso, N, Blotto B, Cairo S, Cajade R, Céspedes J, Corbalán V, Chilote P, Duré M, Falcione C, Ferraro D, Gutierrez FR, Ingaramo MR, Junges C, Lajmanovich R, Lescano JN, Marangoni F, Martinazzo L, Marti R, Moreno L, Natale GS, Pérez Iglesias JM, Peltzer P, Quiroga L, Rosset S, Sanabria E, Sanchez L, Schaefer E, Úbeda C, Zaracho V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuad. Herpetol.* 26, 131-159.
- Van Oordt PGWJ. 1960. The influence of the internal and external factors in the regulation of the spermatogenic cycle in amphibia. *Zool. Soc. London Symp.* 2, 29-52.
- Varma MM. 1977. Ultrastructural evidence for aldosterone and corticosterone-secreting cells in the adrenocortical tissue of the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 33, 61-75.
- Veldhuis HD, Van Koppen C, Van Ittersum M, de Kloet ER. 1982. Specificity of the adrenal steroid receptor system in rat hippocampus. *Endocrinology.* 110, 2044-2051.
- Vitt LJ, Caldwell JP. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 3ra edición. Academic Press, Burlington, Massachusetts, EEUU.
- Volonteri MC, 2009. Rol de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en la espermiación de *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Tesis de licenciatura de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

- Volonteri MC, Ceballos, NR. 2010. Mechanism of hCG-induced spermiation in the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Gen. Comp. Endocrinol. 169, 197-202.
- Volonteri MC, Regueira E, Scaia MF, Ceballos NR. 2013. Characterization and seasonal changes in LH $\beta$  and FSH $\beta$  mRNA of *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Gen Comp Endocrinol. 187, 95-103.
- Vu M, Trudeau VL. 2016. Neuroendocrine control of spawning in amphibians and its practical applications. Gen. Comp. Endocrinol. 234, 28-39.
- Wada M, Wingfield JC, Gorbman A. 1976. Correlation between blood level of androgens and sexual behavior in male leopard frogs *Rana pipiens*. Gen. Comp. Endocrinol. 29, 72-77.
- Wake MH. 1969. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. J. Morphol. 126, 191-331.
- Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S y Xie Z. 2004. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase. J. Biol. Chem. 279, 17250-17259.
- Wang X, Liu Z, Eimerl S, Timberg R, Weiss AM, Orly J, Stocco DM. 1998. Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer. Endocrinology. 139, 3903-3912.
- Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Baker ME, Strauss III JF. 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.
- Welsh TH, Bambino TH, Hsueh AJW. 1982. Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. Biol. Reprod. 27, 1138-1146.
- Whirledge S, Cidlowski JA. 2017. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. Trends Endocrin. Metab. 28, 399-415.
- Wingfield JC y Sapolsky RM. 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. J. Neuroendocrinol. 15, 711-724.
- Witorsch RJ. 2016. Effects of elevated glucocorticoids on reproduction and development: Relevance to endocrine disruptor screening. Crit. Rev. Toxicol. 46, 420-436.
- Xiao Y-C, Huang Y-D, Hardy DO, Li X-K, Ge R-S. 2010. Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. J. Androl. 31, 365-371.

- Xie Z, Askari A. 2002. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. Eur. J. Biochem. 269, 2434-2439.
- Yamanouchi H, Ishii S. 1990. Positive cooperative action of follicle-stimulating hormone on binding of luteinizing hormone to testicular receptors from the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Gen. Comp. Endocrinol. 78, 231-241.
- Yang K, Yu M. 1994. Evidence for distinct isoforms of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine liver and kidney. J. Steroid. Biol. Biochem. Mol. Biol. 49, 245-250.
- Yazawa T, Yamamoto T, Jin Y, Abé SI. 2002. Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). Biol. Reprod. 66, 14-20.
- Yuan Z, Cai T, Tian J, Ivanov AV, Giovannucci DR, Xie Z. 2005. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. Mol. Biol. Cell. 16, 4034-4045.
- Zhang L, Kessler AE, Tsai PS. 2007. Characterization and steroidal regulation of gonadotropin beta subunits in the male leopard frog, *Rana pipiens*. Gen Comp Endocrinol. 150, 66-74.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203-214.
- Zhou M-Y, Gomez-Sanchez EP, Cox DL, Cosby D, Gomez-Sanchez CE. 1995. Cloning, expression, and tissue distribution of the rat nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Endocrinology. 136, 3729-3734.
- Zikov A., Lorenz C, Hoffmann F, Kleiner W, Lutz I, Stöck, M, Kloas W. 2017. Endocrine disruption by environmental gestagens in amphibians - A short review supported by new *in vitro* data using gonads of *Xenopus laevis*. Chemosphere. 181, 74-82.