



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Facultad de Medicina
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Maestría en Biología Molecular Médica

Mecanismo de acción de los productos lipoxigenados sobre la esteroidogénesis

Prof. Lic. María Eugenia Leone

Director de tesina: Dra. Fabiana Cornejo Maciel

Instituto de Investigaciones Biomédicas
(INBIOMED, UBA-CONICET)
Departamento de Bioquímica Humana,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Año 2015

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Medicina y al Departamento de Bioquímica Humana por proporcionar los medios necesarios para la realización de este trabajo de tesina.

A la Dra. Fabiana Cornejo Maciel, Directora de este trabajo de tesina, por su dedicación, por brindarme siempre su apoyo y por haber acompañado mi formación.

Al Dr. Ernesto Podestá, Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesina.

A Mariana, Hernán, Melina e Isabel por la colaboración recíproca en el trabajo realizado durante mi estadía en el laboratorio, compartiendo resultados que se presentan aquí.

A mis hermanos, con quienes compartí momentos inolvidables de mi vida.

A mis sobrinas, por su paciencia y apoyo.

A mis padres, por confiar siempre en mí, apoyarme y darme ganas de seguir creciendo todos los días. Por estar siempre presentes y ser un ejemplo de vida.

A mi marido, por su amor y apoyo incondicional.

Resultados de este trabajo de maestría se presentaron en la LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. El resumen del trabajo titulado “La sobreexpresión del receptor de membrana OxeR1, con alta afinidad para productos de la 5-lipoxigenasa, incrementa la producción de esteroides estimulada por AMPc” (Leone ME, Neuman I, Maloberti P, Cornejo Maciel F.) se publicó en la revista Medicina, volumen 73 (suplemento III), 2013, página 198.

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	40
RESÚMENES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	49

All: angiotensina II

AA: Ácido araquidónico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNh: Ácido ribonucleico horquilla

8Br-AMPc: 8 Bromo - adenosina 3', 5' - monofosfato cíclico

ACTH: Hormona adrenocorticotrofina

DHA: ácido docosaheptaenoico

5-HETE: Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico

5-HpETE: Ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico

LH: Hormona luteinizante

5-LOX: 5-lipoxigenasa

5-oxo-ETE: ácido 5-oxo-eicosatetraenoico

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

P4: Progesterona

RIA: Radioinmunoensayo

Proteína StAR: Steroidogenic acute regulatory protein

INTRODUCCIÓN

La célula debe responder selectivamente a una miríada de estímulos, de acuerdo con sus propias características. Así, una célula puede estar programada para diferenciarse, proliferar o desarrollar alguna función especializada en respuesta a diferentes conjuntos específicos de señales. Dado que las señales moleculares generalmente actúan en forma combinada, el comportamiento de las células de un individuo multicelular puede controlarse de modo altamente específico utilizando unos centenares de moléculas en miles de combinaciones.

Uno de los controles se ejerce a través de señales endócrinas, en las que las hormonas producidas por células endócrinas en cantidades minúsculas son transportadas por el torrente sanguíneo hacia las células efectoras.

Existen diferentes tipos de hormonas según su estructura química: mientras unas se forman a partir del colesterol (hormonas esteroideas), otras se producen a partir de aminoácidos (proteínas, glucoproteínas y derivados de aminoácidos simples).

Independientemente de la naturaleza de la señal, se requiere de un conjunto complementario de proteínas específicas o receptores en cada célula efectora para que ésta responda de modo programado y característico. La molécula señal se une selectivamente al receptor y como resultado de esta interacción se produce una respuesta fisiológica.

Los receptores de las hormonas esteroides se encuentran dentro de la célula efectora y el ligando debe entrar a la célula para activarlos. Los receptores para las hormonas proteicas son proteínas transmembrana de la célula blanco, que se activan cuando se unen a su ligando. Estos receptores actúan como transductores de la señal convirtiendo un evento extracelular, como es la unión del ligando, en señales intracelulares que alteran el comportamiento celular. Los receptores de membrana están usualmente asociados a sistemas de transducción de señales que incluyen la

activación de proteína quinasas que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares específicas, transmitiendo la señal a través de elaboradas interacciones proteicas en cascadas altamente reguladas de fosforilación de proteínas. Estos eventos incluyen fosforilaciones por quinasas de tirosina y/o quinasas de serina/ treonina. La fosforilación cambia la conformación de las proteínas y sus actividades biológicas. El resultado eventual de la activación de los receptores de hormonas esteroideas o de los receptores de hormonas proteicas es una alteración en la actividad celular y un cambio en el programa de los genes que se expresan dentro de las células.

La síntesis de esteroides o esteroidogénesis es una respuesta celular ante un estímulo hormonal que ejemplifica el panorama descrito. Las hormonas que estimulan la producción de esteroides u hormonas esteroidogénicas tienen sus receptores en la membrana plasmática y la vía intracelular de transducción de la señal implica fosfo-defosforilación de proteínas. Esta modificación altera el comportamiento de la célula de modo que se incrementa la velocidad de síntesis de esteroides.

1. HORMONAS ESTEROIDEAS, HORMONAS ESTEROIDOGENICAS Y TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS

Las hormonas esteroideas regulan funciones tan diversas como la diferenciación sexual, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, la regulación del metabolismo de glúcidos y el mantenimiento del equilibrio hidrosalino, entre otras (Cingolani y col., 2000). De acuerdo con su función, las hormonas se agrupan en cinco categorías: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos.

Los tejidos esteroidogénicos donde ocurre la síntesis de hormonas esteroides son la glándula adrenal, gónadas, placenta y sistema nervioso central.

La corteza de la glándula adrenal se divide en tres zonas: zona glomerulosa (ZG), zona fasciculata (ZF) y zona reticularis (ZR) (Geneser, 2000). La corteza de la glándula adrenal produce principalmente dos grupos de hormonas esteroides, los glucocorticoides y los mineralocorticoides. El cortisol es el glucocorticoide predominante en humanos y la aldosterona el mineralocorticoide por excelencia. En el testículo, gónada masculina, son las células intersticiales de Leydig las que producen testosterona, representativo de los esteroides con actividad androgénica.

El control de la síntesis y liberación de esteroides por estos tejidos está ejercido principalmente por las hormonas esteroideogénicas. Estas son las hormonas adrenocorticotrofina (ACTH), luteinizante (LH) y angiotensina II (AII) (Lieberman y col., 2012).

La activación de los receptores de ACTH y LH desencadena la producción de AMPc como segundo mensajero y la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Lieberman y col., 2012). A diferencia de esto, la AII produce diacilglicerol, inositoltrifosfato y calcio con la consecuente activación de la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) (Lieberman y col., 2012).

Ambas vías de transducción de señales tiene al ácido araquidónico como intermediario común.

2. ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso de 20 carbonos poliinsaturado presente en los fosfolípidos de las membranas de las células. Actúa como intermediario en numerosos procesos fisiológicos y es el precursor de diversas moléculas.

Los niveles intracelulares del AA son regulados en respuesta a diferentes agonistas fisiológicos en distintos tejidos (Khan y col., 1995). Luego de la estimulación

de la célula, el AA puede actuar directamente (McPhail y col., 1984; Murakami y col., 1985) o ser metabolizado por tres vías como se muestra en la figura 1:

- La vía de las cicloxigenasas, que conduce a la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.
- La vía de las lipoxigenasas, que lleva a la formación de leucotrienos y ciertos ácidos hidroxilados.
- La vía de las epoxigenasas, que genera epoxiácidos.

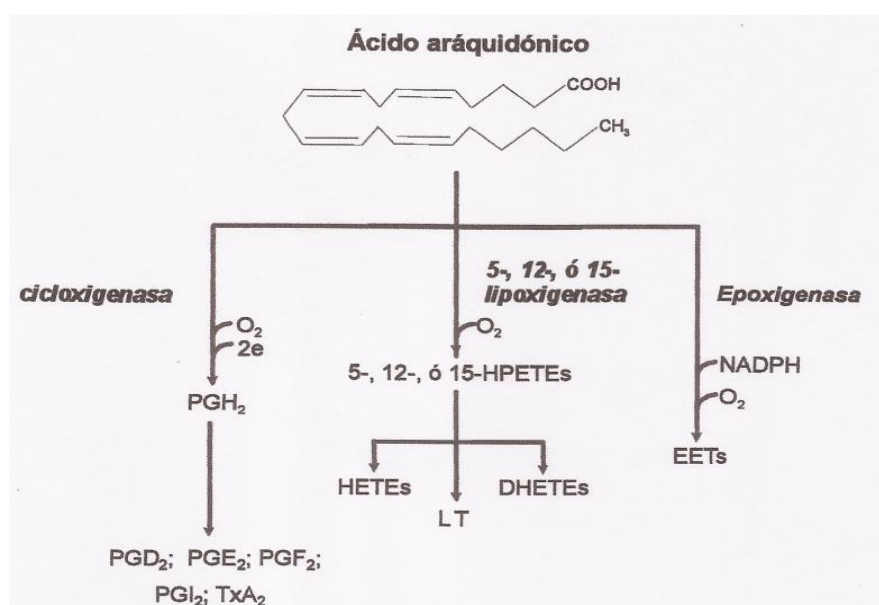


FIGURA 1: METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

PG: prostaglandina; Tx: tromboxano; LT: leucotrieno; HPETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HETE: ácido hidroxeicosatetraenoico; EET: ácido epoxieicosatrienoico; DHETE: ácido dihidroxieicosatetraenoico.

En nuestro laboratorio se describió un mecanismo de liberación de AA que opera tanto en células esteroideogénicas como en sistemas no esteroideogénicos (Maloberti y col., 2002; Neuman y col., 1999; Neuman y col., 2002). En este mecanismo se necesita de la acción concertada de dos enzimas, una acil-CoA sintetasa con preferencia para esterificar el AA (Acsl4) y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2) que libera el AA en la mitocondria. La Acsl4 es una proteína periférica de membranas asociadas a

mitocondrias, de 74 kDa. Su marcada preferencia por el AA como sustrato (Kang y col., 1997) llevó a postular y luego verificar que esta enzima juega un papel importante en la esterificación del AA libre, el cual además es capaz de regular la expresión de esta enzima (Cho y col., 2000). La Acsl4 está presente en la corteza de la glándula adrenal, en células del cuerpo lúteo y estromales de ovario y en células de Leydig de testículo.

La Acot2 es una acil-CoA tioesterasa mitocondrial específica para acil-CoAs conteniendo el grupo acilo de cadena muy larga. La proteína y el ARNm que la codifican están presentes en todos los tejidos esteroideogénicos y en otros tejidos como corazón, hígado y riñón (Finkielstein y col., 1998; Neuman y col., 1999).

La liberación compartimentalizada de AA dirigiría este ácido graso a diferentes vías de metabolización para generar productos cicloxigenados, lipoxigenados o epoxigenados. En la regulación de la esteroideogénesis, la metabolización del AA se dirige hacia los productos lipoxigenados (Maloberti y col., 2007; Wang y col., 2003).

3. PROTEINA StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein)

La proteína StAR es una proteína mitocondrial con función regulatoria en la activación aguda de la producción de esteroides (Clark y col., 1994) ya que determina la accesibilidad del colesterol a la membrana mitocondrial interna (MMI). La transformación del colesterol en pregnenolona es catalizada por el complejo citocromo P450side chain cleavage (P450scc) localizado en la MMI. Mientras que la llegada del colesterol a la MMI es el paso hormonalmente regulado (Crivello y col., 1980), el paso limitante de la transformación de colesterol en los diferentes esteroides es la conversión de colesterol en pregnenolona, a partir de la que se sintetizan los esteroides propios de cada tipo celular.

El patrón de expresión del gen de StAR está restringido a la corteza adrenal, testículo, ovario, riñón y sistema nervioso central, no estando presente en placenta e hígado (Pollack y col., 1997). La proteína debe sintetizarse luego del estímulo hormonal (Artemenko y col., 2001) y sufrir fosforilación dependiente de la PKA (Arakane y col., 1997), ERK (Poderoso y col., 2008) y clivaje proteolítico secuencial (Granot y col., 2003). Se genera entonces la proteína madura de 30 kDa que se localiza y actúa en la membrana mitocondrial externa (Artemenko y col., 2001; Clark y col., 1996; Clark y col., 1994; Epstein y col., 1991).

La evidencia más fuerte respecto del requerimiento de StAR en la síntesis de hormonas esteroideas se manifiesta en la fisiopatogenia de la hiperplasia adrenal congénita (Lin y col., 1995), una rara y grave patología humana, que resulta de mutaciones en el gen de StAR, dando un fenotipo caracterizado por una gran reducción o pérdida total de la síntesis de todos los esteroides adrenales y gonadales. Este fenotipo es idéntico al del ratón “*knock out*” de StAR (Caron y col., 1997).

La expresión de StAR está finamente regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional por ACTH, LH y AII que promueven un incremento en el contenido tanto de su ARNm como de la síntesis y fosforilación de la proteína (Clark y col., 1996; Lin y col., 1995; Stocco, 2001; Stocco y col., 1996). Con respecto a la regulación de la expresión del ARNm de StAR, se han descrito diversos factores involucrados en la transcripción. Tras el análisis de la secuencia promotora del gen, se han identificado regiones específicas para la unión de factores de transcripción. Entre estos se incluyen reguladores positivos como SF1 (steroidogenic factor 1), CREB/CREM (cAMP response-element binding protein/CRE modulation protein), SREBP (sterol regulatory element binding protein), GATA4, C/EBP β y Sp1 entre otros, y reguladores negativos,

el más importante de los cuales es el DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal - adrenal hipoplasia congenita critical region on the X-chromosome).

La inducción de la expresión de StAR por las hormonas esteroideogénicas está mediada al menos en parte por una regulación transcripcional ejercida por el AA (Wang y col., 2003). Como se dijo antes, la estimulación de células esteroideogénicas por sus hormonas tróficas conduce a la movilización y metabolización del AA a través de la vía de las lipoxigenasas (LOX). La acción de la 5-LOX convierte al AA en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HpETE), ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE) y ácido 5-oxoeicosatetraenoico (5-oxo-EETE), como se muestra en la figura 2. Los productos lipoxigenados 5-HpETE y 5-HETE actúan como moduladores positivos del promotor de la proteína reguladora mitocondrial StAR, localizándose el sitio de respuesta en la región -67/-96 del promotor. Sin embargo, nada hay descrito sobre la vía que media entre la producción y metabolización del AA y la inducción de StAR.

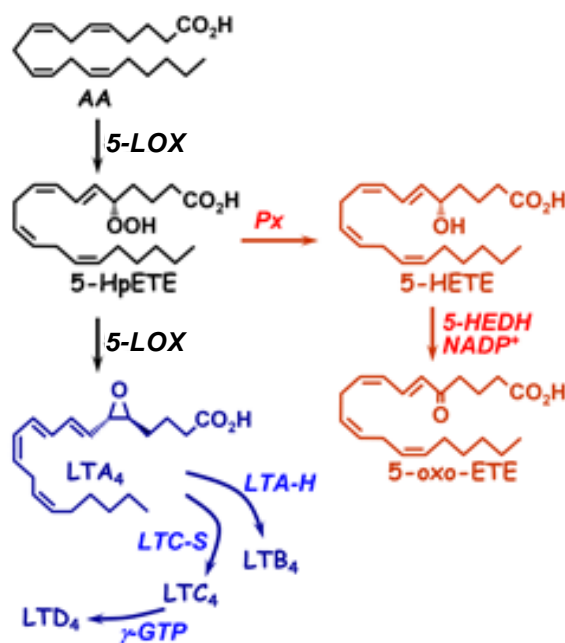


FIGURA 2: METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO POR LA 5-LIPOXIGENASA (5-LOX)

LT: leucotrieno; Px: peroxidasa; 5-HEDH: 5-HETE deshidrogenasa; NADP⁺: nicotinamida-dinucleótido-fosfato; 5-HpETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico; 5-HETE: ácido 5-hidroxicicosatetraenoico; 5-oxo-EETE: ácido 5-oxoeicosatetraenoico.

Todo lo descrito en los puntos precedentes se esquematiza en la figura 3.

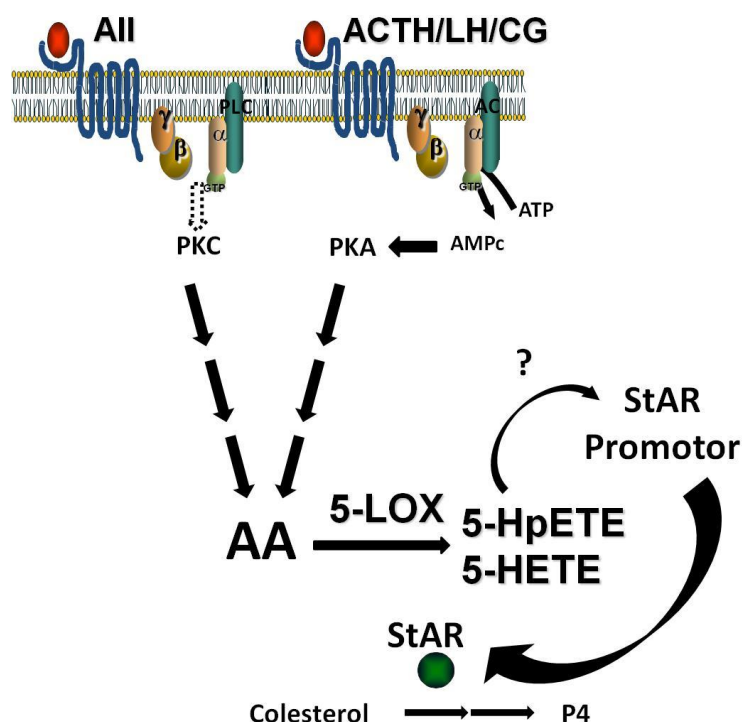


FIGURA 3: ESQUEMA DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES GENERADAS POR HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS QUE LLEVAN A LA ACTIVACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES

All: angiotensina II; ACTH: hormona adrenocorticotrofina; LH: hormona luteinizante; CG: hormona gonadotrofina coriónica; PLC: fosfolipasa C; AC: adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; PKC: proteína quinasa dependiente de calcio; PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc; AA: ácido araquidónico; 5-LOX: 5-lipoxigenasa; 5-HpETE; ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico; 5-HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; StAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein; P4: progesterona.

A partir de estos conocimientos nos preguntamos, ¿cómo se vinculan los productos de metabolización del AA por la vía de las lipoxigenasas con la inducción de la proteína regulatoria StAR y así con la activación de la producción de esteroides?

4. PROTEÍNA DE MEMBRANA OXER1

El gen *OXER1* de origen humano fue clonado y caracterizado en un estudio de desorfanización de receptores acoplados a proteína G (Hosoi y col., 2002; Jones y col., 2003). La proteína codificada por el gen *OXER1*, llamada OXER1, es un receptor de membrana de 7 fragmentos transmembrana (7TMS) específico para 5-oxo-derivados

del AA. Mientras el ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, es antagonista de este receptor, el 5-oxo-ETE y el 5-HpETE son los ligandos de mayor afinidad y respuesta. Estos últimos dos compuestos se producen por metabolización del AA a través de la 5-lipoxigenasa (5-LOX), como se mencionó en el ítem 3 de esta introducción y como se muestra en la figura 2.

El gen se expresa en varios tejidos humanos excepto en cerebro, mostrando una expresión preferencial en leucocitos periféricos, pulmón, bazo, hígado y riñón, con algunas señales menos intensas en el ARNm de la glándula suprarrenal, placenta, ovario y testículos (Hosoi y col., 2002). La expresión observada en eosinófilos, neutrófilos y monocitos humanos correlaciona con los efectos funcionales reportados para el 5-oxo-ETE en esos tipos celulares (Jones, 2005).

Por comparación de la secuencia del gen del *OXER1* humano con los genomas contenidos en bases de datos, se encuentran secuencias homólogas en varias especies (*Bos taurus*, *Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Pongo abelii*, *Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus*, *Otolemur garnettii*, *Canis lupus familiaris* y *Sarcophilus harrisii*). Sin embargo, no se encuentran secuencias con alta homología en el genoma de rata o murino. Más aún, no existen informes describiendo el gen o la proteína en ratones o ratas.

Considerando que los productos lipoxigenados producidos por estímulo hormonal son activadores de la esteroidogénesis y que el receptor de membrana *OXER1* es mediador de las acciones de los productos lipoxigenados en otros tejidos, hipotetizamos que los efectos del AA estarían mediados por el *OXER1* en sistemas esteroidogénicos. En el presente trabajo se evaluó la presencia del *OXER1* en células esteroidogénicas y su participación en la activación hormonal de la esteroidogénesis.

5. LÍNEAS CELULARES

Se han obtenido múltiples líneas celulares esteroideogénicas de amplia difusión y reconocidas como modelos para el estudio de la activación aguda de la producción de esteroides (Havelock y col., 2004; Rainey y col., 1994; Rainey y col., 2004; Schimmer y col., 1995; Schimmer y col., 1984). Para desarrollar este trabajo utilizamos las líneas celulares H295R y MA-10.

La línea H295R son células adrenocorticales de origen humano que responden a ACTH, All y K^+ secretando cortisol, aldosterona e intermediarios (Bird y col., 1993; Rainey y col., 2004).

La línea MA-10 fue originada a partir de células de Leydig de testículo de ratón (Ascoli, 1981). Las células MA-10 son respondedoras a LH/CG produciendo progesterona como principal esteroide en el medio de cultivo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Con el objetivo general de generar nuevos conocimientos sobre el mecanismo de acción de hormonas esteroideogénicas, en el presente trabajo se planteó la hipótesis que el receptor OXER1 está presente en células esteroideogénicas y que interviene como mediador en la activación de la esteroideogénesis.

Para poner a prueba esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- evaluar la presencia del receptor de membrana OXER1 en células esteroideogénicas
- verificar el efecto de la activación e inhibición farmacológica del OXER1 sobre la funcionalidad de células esteroideogénicas
- generar herramientas de biología molecular para modificar la expresión del gen *OXER1*
- verificar la capacidad de estas construcciones en células esteroideogénicas para modificar el nivel de expresión del gen *OXER1*
- verificar el efecto de la sobreexpresión del gen *OXER1* sobre la funcionalidad de células esteroideogénicas
- generar una línea celular esteroideogénica que sobreexpresa el OXER1 de forma estable

Como modelo de estudio se utilizaron dos sistemas productores de esteroides: células adrenocorticales de origen humano de la línea H295R y células de Leydig de ratón de la línea MA-10.

La presencia del ARNm y de la proteína OXER1 se evaluó en células de la línea H295R de origen humano por RT-PCR y western blot respectivamente.

El rol funcional de OXER1 se determinó utilizando:

- compuestos descritos como agonista y antagonista del receptor, 5-oxo-ETE y DHA respectivamente para modificar la actividad del OXER1 y

- herramientas de biología molecular para modificar los niveles de expresión de OXER1.

Luego de modificar la actividad o el nivel de expresión del OXER1 en células esteroideogénicas, se evaluó el efecto sobre la inducción de StAR y producción de esteroides estimulada por vías dependientes e independientes de AMPc.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. INSUMOS

A continuación se indica el origen de drogas y reactivos utilizados.

Acrilamida, bisacrilamida, Temed™, 8Br-adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), estándares de peso molecular para electroforesis, Hepes, BSA, Tris-HCl, glicina, ITS + 1, medio de cultivo Waymouth MB/752, SDS, Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co.

Tripsina-EDTA, medio de cultivo DMEM/F12, suero de caballo, gentamicina, penicilina-estreptomicina, membrana de PVDF, anticuerpo secundario que reconoce IgG de conejo acoplados a peroxidasa provinieron de Invitrogen™.

El reactivo de extracción de ARN TRI Reagent® se obtuvo de Genbiotech.

El suero cosmic provino de HyClone.

El reactivo Bio-Lumina de detección de western blots por quimioluminiscencia fue adquirido a Productos Bio-Logicos (PB-L).

El anticuerpo primario policlonal anti-OXER1 se obtuvo de Cayman Chemical.

Otros reactivos, sales y solventes fueron reactivos comerciales de la mejor calidad disponible.

2. CÉLULAS PRODUCTORAS DE ESTEROIDES

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron células esteroidogénicas de Leydig y adrenocorticales. Los cultivos de las líneas celulares MA-10 y H295R se detallan a continuación.

2.1. Línea celular MA-10

Las células de la línea MA-10 fueron generosamente cedidas por el Dr. Mario Ascoli (Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa, EEUU). Los cultivos se realizaron en el

medio Waymouth MB/752 complementado con 20 mM de Hepes, 1,12 g/l de NaHCO_3 , 15 % de suero de caballo y 50 mg/l de gentamicina a 37 °C y 5 % de CO_2 como se describió anteriormente (Ascoli, 1981). Las células MA-10 en cultivo fueron estimuladas en ausencia de suero con 8Br-AMPC, análogo permeable del segundo mensajero de las hormonas LH y CG. Se utilizó una concentración submáxima (0,25 mM) con el fin de evidenciar efectos tanto estimulatorios como inhibitorios en las distintas condiciones.

2.2. Línea celular H295R

Las células de la línea H295R (Gazdar y col., 1990; Rainey y col., 2004) fueron compradas a la ATCC. Los cultivos se realizaron en el medio de DMEM/F12 complementado con 5 % de suero cosmic, 1 % ITS + 1, 200 UI/ml de penicilina y 200 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las células H295R en cultivo fueron estimuladas en ausencia de suero con 8Br-AMPC, análogo permeable del segundo mensajero de la hormona ACTH y con All. En ambos casos, se utilizaron concentraciones submáximas (0,5 mM y 10^{-8} M respectivamente) con el fin de evidenciar efectos tanto estimulatorios como inhibitorios en las distintas condiciones.

3. TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo de tesis se realizaron aplicando protocolos publicados. En todos los casos se cita bibliografía como referencia.

La metodología y soluciones utilizadas en las técnicas básicas de biología molecular (cultivos bacterianos, preparación y transformación de bacterias competentes, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio) se encuentran descritas en Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., 1995).

La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza se evaluó midiendo la relación de absorbancias a 260 y 280 nm.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las imágenes digitales de las separaciones electroforéticas y autoradiografía se obtuvieron con una cámara Kodak Easyshare Z7121S o con un escáner Hewlett-Packard. La intensidad de las bandas se cuantificó con el software Gel-Pro analyzer (IPS).

Se utilizaron herramientas bioinformáticas para la verificación de secuencias en bases de datos públicas (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los sistemas comerciales de procesamiento de muestras se utilizaron siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y western blot

El análisis de las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó conforme a la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), con geles separadores de 10 % de acrilamida utilizando el sistema MiniProtean 2 (BioRad). Finalizada la electroforesis se realizó el análisis de las proteínas por western blot según la técnica descrita por Towbin (Towbin y col., 1979). Luego de la electrotransferencia las membranas de PVDF se procesaron incluyendo un bloqueo de sitios inespecíficos, incubación con primer anticuerpo específico e incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-IgG de conejo generado en cabra).

La proteína específica se evidenció por detección autorradiográfica de la señal quimioluminiscente utilizando el reactivo comercial Bio-Lumina.

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTEROIDES

La concentración de progesterona, liberada al medio de incubación de las células MA-10 y H295R se determinó por radioinmunoanálisis (RIA). El procedimiento detallado está descrito en la bibliografía (Maloberti y col., 2002).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y fueron repetidos independientemente al menos tres veces. Los datos están informados como media \pm EEM de los 3 (o más) experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA siguiendo a Student Newman-Keuls utilizando software InStat (GraphPad software Inc., San Diego, California). Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL OXER1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

El gen *OXER1* se conoció recién en el año 2003, a partir de un trabajo de desorfanización de receptores acoplados a proteínas G de origen humano (Hosoi y col., 2002; Jones y col., 2003). Su secuencia se registra en el GenBank como NM_148962.4 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/116089274>) y se muestra en la figura 4. El transcripto de este gen está presente en una amplia variedad de tipos celulares (Hosoi y col., 2002).

```

1 ggctgcaggg ttccccttgg cctgcaaaca ggaacacagg gtgtttctca gtggctgca
61 gaatgctgat gaaaacccca ggatgtttgt tcaccgtggt ggccagctga tagtgccaat
121 catcccactt tgccctgagc actcctgcag gggtagaaga ctccagaacc ttctctcagg
181 cccatggccc aagcagccca tggaaactta taacctgagc tctccatctc cctctctctc
241 ctctctgttt ctccctccct ccttctctcc ctaccctcc tctgctccct ctgcctttac
301 cactgtgggg gggctctctg gagggcctg ccaccccacc tcttctctgc tgggtctctg
361 cttcctggca ccaatcctgg ccttggagtt tgtctggggc ctgggtggga acagtttggc
421 cctcttcatc ttctgcatcc acacgcggcc ctggacctcc aacacggtgt tcctggtcag
481 cctgggtggc gctgacttcc tcctgatcag caacctgccc ctccgcgtgg actactacct
541 cctccatgag acctggcgct ttggggctgc tgccctgcaa gtcaacctct tcattgctgtc
601 caccaaccgc acggccagcg ttgttctct cacagccatc gcactcaacc gctacctgaa
661 ggtggtgtag cccaccacg tctgtagccg tgcttccgtg ggggcagctg cccgggtggc
721 cgggggactc tgggtgggca tcctgctct caacgggcac ctgctcctga gcaccttctc
781 cggcccctcc tgccctcagc acaggggtgg cacgaagccc tcggcctcgc tccgctggca
841 ccaggcactg tacctgctgg agttcttct gccactggcg ctcatcctct ttgctattgt
901 gagcattggg ctaccatcc ggaaccgtgg tctgggcggg caggcaggcc cgcagagggc
961 catgctgtgt ctggccatgg ttggtggcct ctacaccatc tgcttcttgc ccagcatcat
1021 ctttggcatg gcttcctatgg ttgctttctg gctgtccgcc tgccgatccc tggacctctg
1081 cacacagctc ttccatggct ccctggcctt cacctacctc aacagtgtcc tggaccccgt
1141 gctctactgc ttctctagcc ccaacttctt ccaccagagc cgggccttgc tgggcctcac
1201 gcggggcccg cagggcccag tgagcgacga gagctcctac caaccctcca ggcagtggcg
1261 ctaccgggag gctcttagga aggcggaggc cataggggag ctgaaagtgc agggcgaggt
1321 ctctctggaa aaggaaggct cctcccaggg ctgagggcca gctgcagggc tgcagcgtg
1381 tgggggtaag ggctgccgcy ctctggcctg gagggacaag gccagcacac ggtgctcaa
1441 ccaactggac aagggatggc ggcagaccag gggccaggcc aaagcactgg caggactcag
1501 gtgggtggca gggagagaaa cccacctagg cctctcagtg tgtccaggat ggcattccca
1561 gaatgcaggg gagagcagga tgccgggtgg aggagacagg caaggtgccg ttggcacacc
1621 agctcagaca ggggcctcgc cagctgcagg ggacagacgc caatcactgt cacagcagag
1681 tcaccttaga aattggacag ctgcatgttc tgtgctctcc agtttgtccc ttccaatatt
1741 aataaacttc ctttttaaat ataaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1801 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

FIGURA 4: SECUENCIA DEL OXER1

Secuencia de nucleótidos del ARNm del *OXER1*, Homo sapiens, NCBI Reference Sequence NM_148962.4. En rojo se marcan los codones de inicio y finalización de la traducción, en verde se marca la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR un fragmento interno en el análisis de expresión (ítem 1 de Resultados), en fucsia se marca la secuencia utilizada para el silenciamiento de la expresión (ítem 3.1. de Resultados) y en amarillo se marca la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar por PCR el fragmento a clonar en este trabajo (ítem 3.3. de Resultados).

La presencia del *OXER1* en células esteroideogénicas se evaluó en células adrenocorticales humanas de la línea H295R determinando la presencia del ARNm (por retrotranscripción o RT y reacción en cadena de la polimerasa, Polymerase Chain Reaction o PCR) y de la proteína (por western blot).

Para determinar la presencia del ARNm del *OXER1* se realizó una RT-PCR a partir del ARN de células H295R. Para ello, se extrajo el ARN total utilizando la técnica de Chomczynski, (Chomczynski, 1993) con un reactivo que permite una extracción en un único paso (TRI Reagent®, MCR). El contenido de ácidos nucleicos se cuantificó como se indica en Materiales y Métodos.

Dado que el *OXER1* es un gen libre de intrones, la contaminación del ADN genómico debía ser considerado de forma especial. Por lo tanto, antes de realizar la PCR, se llevó a cabo un tratamiento con ADNasa sobre las muestras de ARN para eliminar la contaminación de cualquier ADN genómico. Para ello, se trataron 4 µg de ARN con ADNasa (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de la reacción se sometió a la RT con oligodesoxinucleótidos con secuencias generadas al azar (random primers) utilizando la enzima MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos cebadores remarcadas en verde en la figura 4. El tamaño del amplicón resultante es de 449 pb. Luego de la PCR, la mezcla de reacción se sometió a una separación electroforética en gel de agarosa. Se usó una concentración de agarosa de 1,5 % y la corrida se realizó a voltaje constante a 80-100 v. La tinción con bromuro de etidio y observación bajo luz UV mostró un fragmento de amplificación del tamaño esperado, como se muestra en la figura 5, panel a, carril RT+. No hubo amplificación cuando la PCR fue realizada sin transcripción

reversa previa (figura 5, panel a, carril RT-). Este resultado evidencia el efectivo tratamiento con ADNasa, removiendo el ADN genómico.

Para determinar la presencia de la proteína OXER1 se realizó un western blot a partir del lisado total de células H295R. El análisis por western blot evidenció una señal correspondiente a la expresión del OXER1 en las células H295R del tamaño molecular esperado (50 kDa, figura 5, panel b).

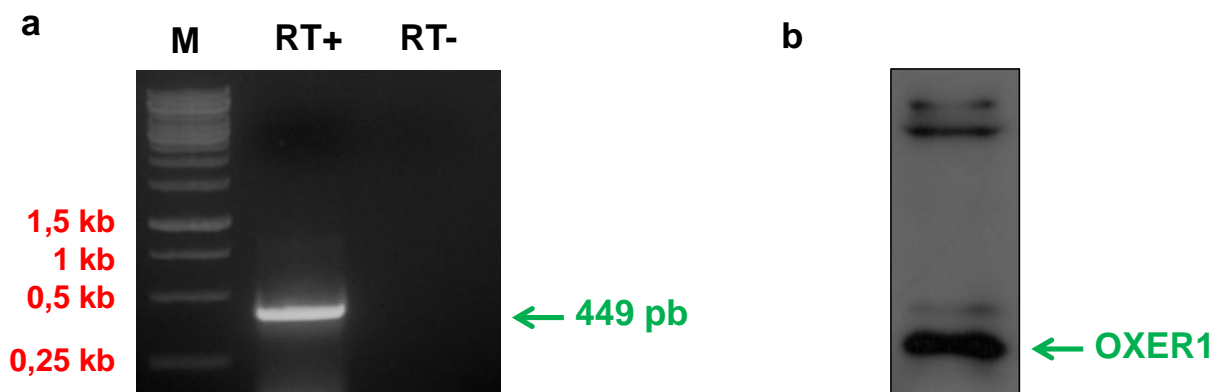


FIGURA 5: EXPRESIÓN DEL OXER1 EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES H295R DE ORIGEN HUMANO

Panel a: A partir del ARN total extraído de un cultivo de células H295R, se realizó la RT-PCR con iniciadores específicos del *OXER1* humano. El producto de la amplificación se separó por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. La figura muestra una imagen del gel teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. RT+: muestra con transcriptasa reversa; RT-: control negativo: muestra sin transcriptasa reversa. En rojo se marca el tamaño del estándar de peso molecular y en verde se señala el fragmento obtenido y se indica su tamaño.

Panel b: La expresión de OXER1 se evaluó en los lisados totales de células H295R por western blot utilizando anticuerpos comerciales específicos. En verde se marca la banda específica.

2. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN FARMACOLÓGICAS DEL RECEPTOR OXER1 SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS

Los cultivos de las células adrenocorticales H295R se trataron con o sin DHA (50 μ M) o 5-oxo-ETE (500 nM) y se incubaron en presencia y ausencia de 8Br-AMPC (0,5 mM) o AII (10^{-8} M). Luego de 3 hs, se determinó la concentración de aldosterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo. Los resultados se muestran en la figura 6. La estimulación de las células con 8Br-cAMP o AII resultó en el ya conocido incremento en

la producción de aldosterona. El agregado del antagonista DHA disminuyó la respuesta a ambos estímulos, sin afectar la síntesis basal de esteroides. El tratamiento de los cultivos de células H295R con 8Br-AMPC junto con el 5-oxo-ETE, agonista de mayor afinidad y respuesta, aumentó la producción de aldosterona.

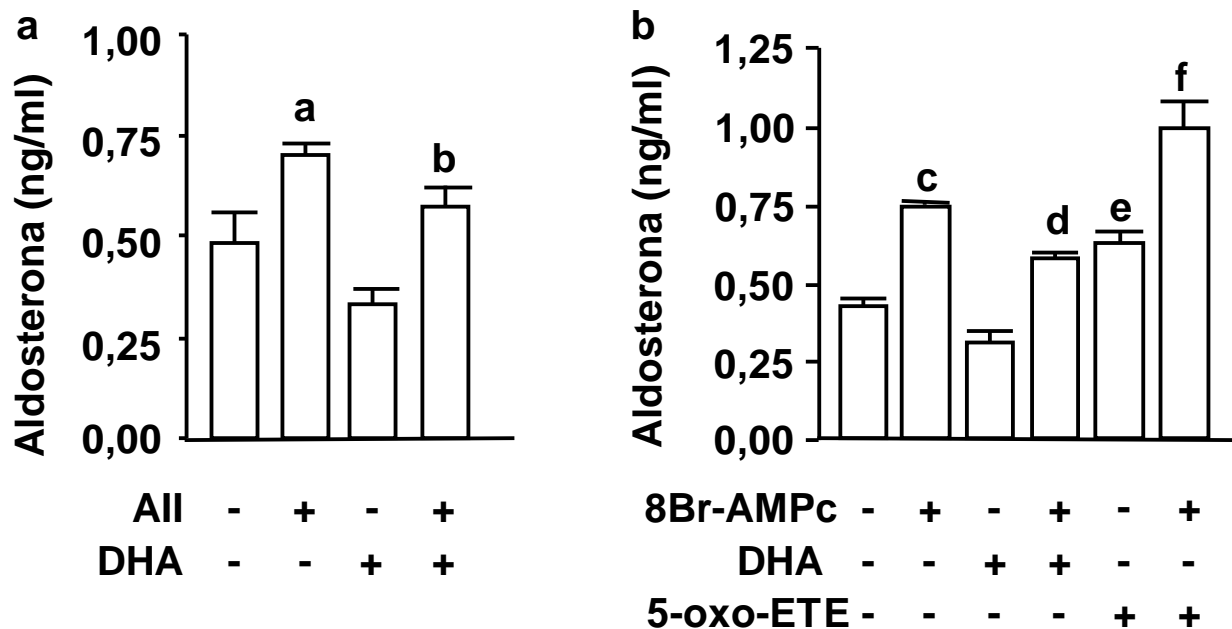


FIGURA 6: EFECTO DEL AGONISTA Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR OXER1 SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS ESTIMULADA POR ANGIOTENSINA II Y AMPc EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES DE LA LÍNEA H295R

Las células adrenocorticales humanas de la línea H295R se trataron con o sin ácido docosahexaenoico (DHA, 50 μ M) o 5-oxo-ETE (500 nm) y se incubaron en presencia y ausencia de 8Br-AMPC (0,5 mM) o Angiotensina II (10^{-8} M). Luego de 3 hs, se determinó la concentración de aldosterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo. Los resultados se expresan en ng aldosterona/ml de medio como media \pm EEM de tres experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. control sin All; b, $P < 0,05$ vs. All; c, $P < 0,001$ vs. control sin AMPc; d, $P < 0,05$ vs. AMPc; e, $P < 0,05$ vs. control sin AMPc; f, $P < 0,001$ vs. AMPc

3. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA SILENCIAMIENTO Y SOBREEXPRESIÓN DEL GEN OXER1

El uso del agonista y antagonista farmacológicos descrito en el ítem anterior aportó evidencias de que el OXER1 estaría involucrado en la regulación de la esteroideogénesis activada por dos vías de transducción de señales. Para identificar al OXER1 como mediador de la respuesta celular se aplicó una segunda estrategia. Esta consistió en la modificación de los niveles de la proteína OXER1. Para ello fue

necesario primero generar plásmidos recombinantes para la sobreexpresión y el silenciamiento del *OXER1*, procedimiento que se detalla a continuación. Una vez verificada la funcionalidad de la herramienta (ítem 4 de esta sección), se evaluó su efecto sobre la esteroidogénesis y niveles de expresión de StAR (ítem 5).

3.1. Fragmento de ARNi para el silenciamiento del *OXER1*

Para el silenciamiento del gen se utilizó un pequeño ARN de interferencia (ARNi) de 19 bases que específicamente silencian el *OXER1*, secuencia marcada en fucsia en la figura 4. Esta secuencia fue diseñada con la plataforma siDesign Center de la empresa Dharmacon (<http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/>).

Los oligonucleótidos para el silenciamiento específico de *OXER1* se introdujeron en las células utilizando el plásmido pSUPER.retro.puro (figura 7) (OligoEngine). La secuencia específica de 19 nucleótidos se agregó en el vector dentro de un fragmento mayor de ADN de doble cadena de 60 nucleótidos. Ambas cadenas contienen las secuencias de 19 nucleótidos específicos en orientación sentido y antisentido separadas por una secuencia espaciadora de 9 nucleótidos y enmarcadas por sitios de corte para las enzimas de restricción BgIII y HindIII. Estas características le confieren al fragmento la capacidad de replegarse sobre sí mismo una vez transcrito, constituyendo una estructura secundaria, bucle u horquilla, que le da el nombre de ARNh (horquilla). El bucle del transcrito precursor es rápidamente clivado en la célula produciendo el ARN de interferencia funcional, que lleva a la degradación específica del ARNm de la proteína de interés y, consecuentemente, a una disminución de la traducción del mensaje.

Con los mismos 19 nucleótidos que constituyen el ARNi específico ordenados de forma aleatoria se diseñó otro fragmento, denominado ARNi-scrambled, para utilizar como control.

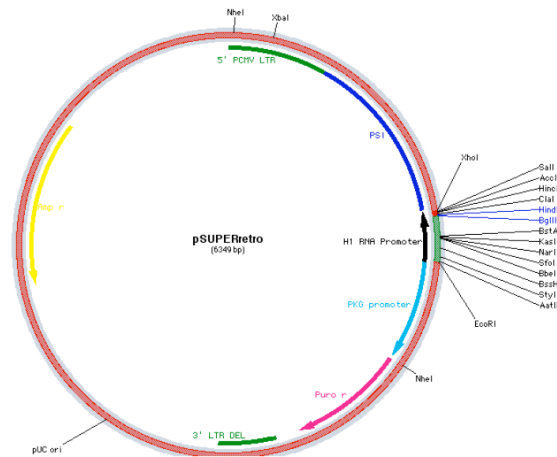


FIGURA 7: ESQUEMA DEL PLÁSMIDO UTILIZADO PARA EL SILENCIAMIENTO

Todos los oligómeros de 60 nucleótidos detallados en la tabla 1 usados luego para insertar en el plásmido vector fueron sintetizados por Invitrogen. El análisis por BLAST demostró que estas secuencias reconocen específicamente el OXER1 de origen humano (OXER1 cadena 1 y cadena 2) o no reconocen ningún ARNm conocido de origen humano (ARNi-scrambled cadena 1 y cadena 2).

Nombre	Secuencia (5'-3')
OXER1 ARNi cadena 1	GATCCCC GGCGAGGTCTCTGGAAT TTCAGAGAT TTCCAGAGAGACCTCGCC TTTTTA
OXER1 ARNi cadena 2	AGCTTAAAA GGCGAGGTCTCTGGAAT TCTCTTGA TTCCAGAGAGACCTCGCC GGG
Scrambled ARNi cadena 1	GATCCCC GCGACGCGATCGGTTATG ATTCAAGAGAT CATAACCGATCGCGT CGCTTTTTA
Scrambled ARNi cadena 2	AGCTTAAAA GCGACGCGATCGGTTATG ATCTCTTGA ATCATAACCGATCGCGT CGCGGG

TABLA 1: OLIGONUCLEÓTIDOS SINTETIZADOS PARA GENERAR ARNhs.

La secuencia de nucleótidos de silenciamiento específico de OXER1 en orientación sentido y antisentido se resalta en color rojo.

3.2. Construcción del vector para silenciamiento

El vector conteniendo el fragmento para el silenciamiento se construyó siguiendo el procedimiento en 3 etapas indicado por Oligoengine, fabricante del plásmido pSUPER.retro.puro: 1) Hibridación de los dos oligómeros de 60 nucleótidos (cadena 1 y cadena 2) con generación de una doble cadena de ADN, 2) Linealización del vector y 3) Ligación del ADN con el vector.

La linealización del vector se realizó por tratamiento del pSUPER.retro.puro con enzimas de restricción (BglIII y HindIII), separación electroforética en geles de agarosa y purificación utilizando el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se realizó con T4 ADN ligasa (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Así se generaron las construcciones pSUPER.retro.puro-*OXER1* y pSUPER.retro.puro-scrambled.

3.3. Fragmento de ADNc para expresión del *OXER1*

Para clonar el ADNc del *OXER1* se realizó una RT-PCR a partir del ARN de células H295R, según se describió en detalle en el ítem 1 de los Resultados. Para la PCR se utilizaron oligonucleótidos cebadores y condiciones descritas en la identificación y caracterización del *OXER1* (Hosoi y col., 2002). Las secuencias de los cebadores están remarcadas en amarillo en la figura 4. El tamaño del amplicón resultante es de 1467 pb.

Luego de la PCR, la mezcla de reacción se sometió a una separación electroforética en gel de agarosa realizados como se indican en el Ítem 1 de esta sección. La tinción con bromuro de etidio y observación bajo luz UV mostró un fragmento de amplificación del tamaño esperado, aproximadamente 1,5 kb como se muestra en la figura 8. Luego de la purificación utilizando el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) según las instrucciones del fabricante, la identidad del fragmento amplificado se corroboró por secuenciación completa realizada por un servicio privado (Macrogen). Los resultados de la secuenciación confirmaron una homología del 100% con la secuencia publicada para el ARNm que codifica para *OXER1*.

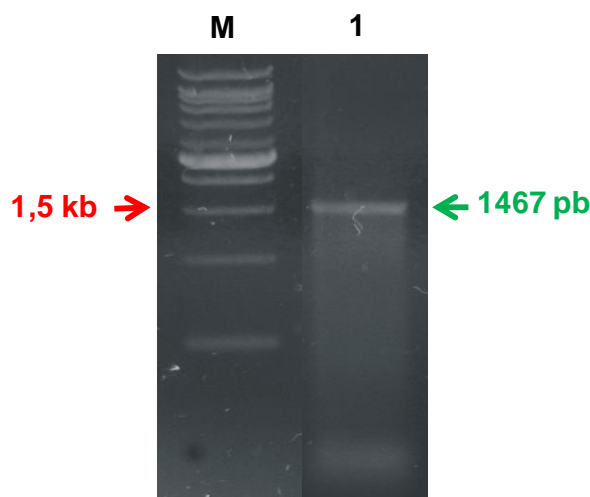


FIGURA 8: ADNc DE *OXER1* EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES H295R DE ORIGEN HUMANO

A partir del ARN total extraído de un cultivo de células H295R, se realizó la RT-PCR con iniciadores específicos del *OXER1* humano. El producto de la amplificación se separó por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. La figura muestra una imagen del gel teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. Carril 1: muestra; carril M: Marcador de peso molecular. En rojo se marca el tamaño del estándar de peso molecular y en verde se señala el fragmento obtenido y se indica su tamaño.

3.4. Construcción de los vectores para expresión

En un primer paso, el fragmento producto de PCR obtenido se clonó en un vector recomendado para el clonado de productos de PCR, el vector pGEM®-T Easy (Promega, figura 9, panel a). Este es un vector linealizado al que se le agregaron unidades individuales de timidina en ambos extremos 3'. Estas unidades de timidina sobresalientes en el sitio de inserción mejoran la eficiencia de la ligación de los productos de PCR en el plásmido al aportar terminales compatibles con productos de PCR generados por ciertas polimerasas. Estas a menudo agregan un único residuo de deoxiadenosina en el extremo 3' del fragmento amplificado, de manera independiente del ADN molde que se amplifica. El vector pGEM®-T Easy contiene también una región múltiple de clonado, dentro del gen que codifica a la β -galactosidasa. La inactivación de este gen por inserción del fragmento a clonar permite la identificación de bacterias transformadas por el color blanco -o más precisamente por la falta de color azul-

desarrollado por las bacterias que incorporaron el vector recombinante al crecer en un medio con isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG), un inductor de la β -galactosidasa, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), sustrato cromogénico de la enzima. La región múltiple de clonado contiene sitios de reconocimiento para múltiples enzimas de restricción. EcoRI, BstZI y NotI son las tres enzimas que hidrolizan el vector a ambos lados del sitio de clonado, por lo que son útiles para la liberación del inserto. El clonado del *OXER1* se realizó en el sitio EcoRI debido a que también se encuentra presente en los dos plásmidos de expresión que se describen a continuación.

Para generar herramientas para la transfección transitoria y estable del gen *OXER1*, el fragmento obtenido se incorporó a dos plásmidos: pRc/CMVi y pBABE. El pRc/CMVi es una modificación del pRc/CMV que mejora su uso en transfecciones cuyo objetivo es la mera expresión transitoria del gen. Es una modificación basada en la digestión con BamHI y posterior religación del plásmido pRc/CMV originalmente obtenido de InvitrogenTM. El pRc/CMVi tiene un tamaño de 3450 pb y fue gentilmente cedido por Ingo Leibiger (figura 9, panel b) (Leibiger y col., 1999). El pBABE (5558 pb, Addgene) está descrito para la expresión en forma estable, permitiendo la generación de líneas celulares por selección con el antibiótico higromicina (figura 9, panel c). Ambos plásmidos contienen un gen de resistencia a ampicilina para la selección de bacterias transformadas.

El fragmento de 1,5 kb del *OXER1* fue clonado en sitios EcoRI de los tres vectores mencionados.

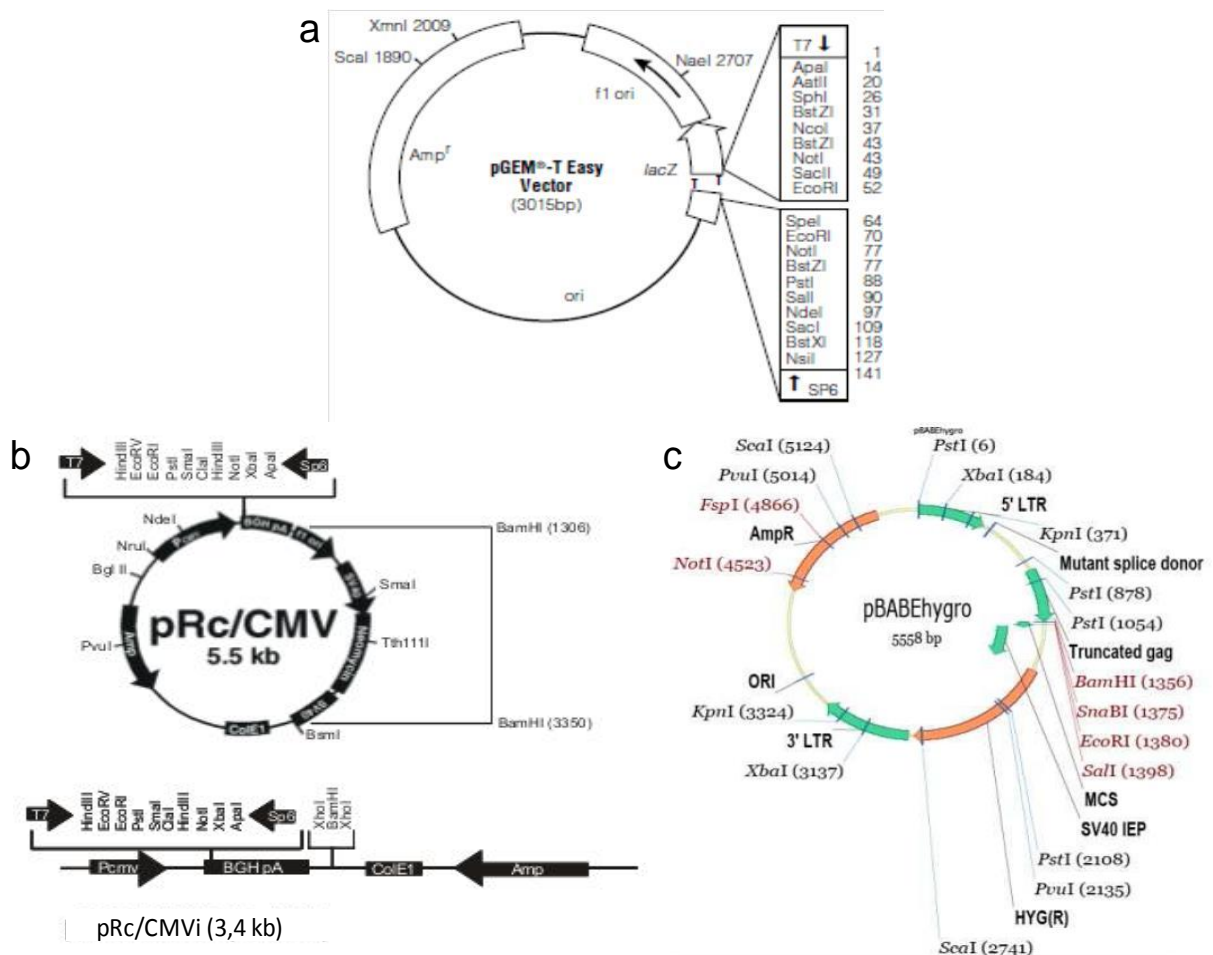


FIGURA 9: ESQUEMA DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA LA EXPRESIÓN DEL ADnc

Panel a: pGEM®-T Easy; panel b: pRc/CMVi; panel c: pBABE

La inserción del fragmento de 1,5 kb del *OXER1* en los plásmidos se realizó en 3 etapas: 1) Purificación del fragmento a clonar, 2) Linealización del vector y 3) Ligación del ADN con el vector.

El fragmento *OXER1* obtenido por RT-PCR y purificado según se indicó en el ítem 3.3, se ligó al plásmido pGEM®-T Easy lineal por tratamiento con T4 ADN ligasa (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante, obteniéndose el plásmido recombinante pGEM®-T Easy-*OXER1*.

Luego, el fragmento a clonar del *OXER1* se obtuvo por tratamiento de la construcción pGEM®-T Easy-*OXER1* con la enzima EcoRI, enzima también usada

para la linealización del pRc/CMVi y pBABE. Tanto el fragmento *OXER1* como los vectores linealizados se separaron por electroforesis en geles de agarosa y purificación utilizando el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega).

El fragmento *OXER1* y cada uno de los vectores, pRc/CMVi y pBABE, todos enmarcados en sitios EcoRI, se ligaron utilizando T4 ADN ligasa (Promega).

3.5. Amplificación y caracterización de los vectores

La amplificación de los plásmidos recombinantes se realizó por transformación de bacterias *Escherichia coli* de la cepa XL1-Blue (Stratagene Labs Systems). Previamente, las bacterias se hicieron competentes por tratamiento con CaCl₂ en frío (Ausubel y col., 1995) y se conservaron a -70 °C hasta el momento de uso. El método empleado para la transformación de las bacterias *Escherichia coli* competentes es una variación del método de Hanahan (Hanahan, 1983), que consiste en realizar un shock térmico a 42 °C por 45 segundos a una mezcla de las bacterias con el ADN plasmídico (Ausubel y col., 1995). Las bacterias transformadas se crecieron en medio Luria Bertani (LB) con agar y ampicilina como antibiótico de selección (LB-agar-ampi) a 37 °C durante una noche. Para el clonado en pGEM®-T Easy este crecimiento se realizó en presencia de IPTG, 20 mM y X-Gal, 80 µg/ml.

Luego, se eligieron colonias para analizar el contenido plasmídico. En los cultivos de bacterias transformadas con el pGEM®-T Easy recombinante se eligieron colonias blancas para el análisis y en las transformadas con pSUPER.retro.puro, pRc/CMVi, pBABE recombinantes la elección fue al azar.

El ADN plasmídico se purificó a pequeña y mediana escala, utilizando el sistema de purificación de ADN Wizard® Plus Minipreps (Promega) o ADN Wizard® Plus Midipreps (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. La purificación por Minipreps se utilizó luego de la transformación de bacterias con el pSUPER.retro.puro,

pGEM®-T Easy, pRc/CMVi y el pBABE recombinantes, para identificar colonias de bacterias transformadas con el plásmido de interés. La purificación por Midipreps se utilizó rutinariamente luego de la transformación de bacterias para obtener cantidades significativas de los plásmidos de interés para su uso experimental. Una vez caracterizadas las colonias, las bacterias transformadas con los plásmidos de interés se conservaron en medio LB conteniendo glicerol 25 % a -70 °C.

Para identificar colonias de bacterias transformadas con el plásmido de interés se hizo la caracterización de los ADN plasmídicos (obtenidos por Minipreps) por mapas de restricción, utilizando enzimas provistas por Promega. Los productos de la acción de las endonucleasas se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, realizados como se indican en el ítem 1 de esta sección.

El mapa de restricción del pSUPER.retro.puro recombinante se realizó con las enzimas EcoRI y HindIII. La figura 10 muestra el resultado obtenido al analizar el ADN de dos colonias. Ambas fueron consideradas positivas por generar un fragmento de 281 pares de bases como indica el fabricante.

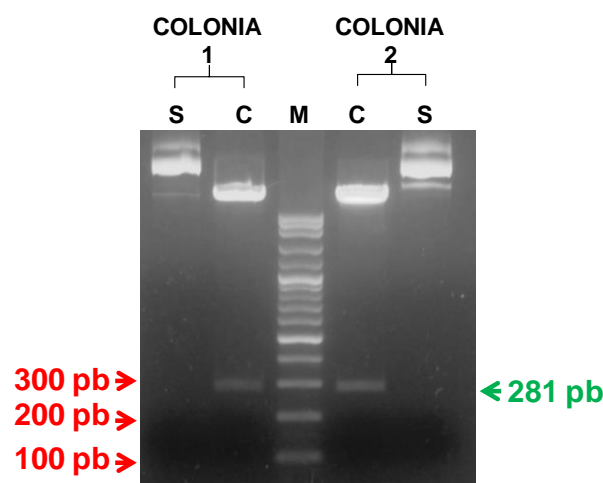


FIGURA 10: MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pSUPER.retro.puro-*OXER1*

El plásmido pSUPER.retro.puro recombinante proveniente de bacterias de dos colonias se trató sin enzima (S) y con (C) EcoRI y HindIII. Carril M: marcador de peso molecular.

Las mezclas de reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se tomó la imagen bajo luz UV. En rojo se marca el tamaño de los estándares de peso molecular y en verde se señala el tamaño del fragmento específico.

El mapa de restricción del pRc/CMVi recombinante se realizó con las enzimas EcoRI y Aval. La figura 11 muestra los resultados obtenidos con el ADN de una colonia, donde el tratamiento con EcoRI separó el fragmento completo de aproximadamente 1,5 kb del ADNc del *OXER1* (figura 11, carril 4). El tratamiento con Aval generó un fragmento de 800 pb (figura 11, carril 2), indicador de la ubicación sentido del fragmento del ADNc del *OXER1* en el pRc/CMVi. Esta colonia se eligió por contener el inserto del tamaño esperado en sentido correcto para la expresión. El pRc/CMVi vacío fue tratado con las mismas enzimas de restricción, verificando que no se liberó ningún fragmento en ninguno de los dos casos (figura 11, carriles 1 y 3).

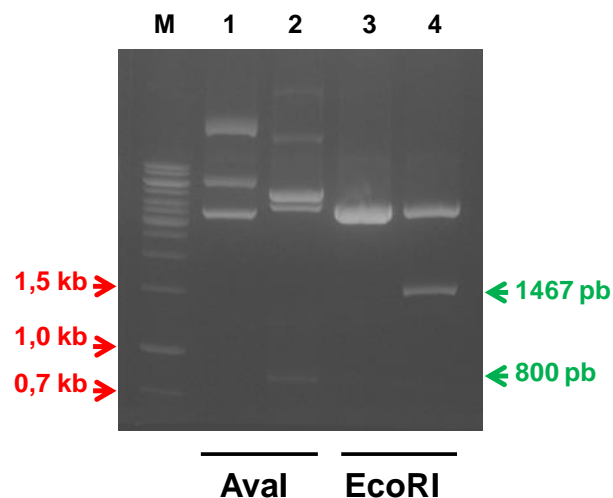


FIGURA 11: MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pRc/CMVi-OXER1

El plásmido pRc/CMVi vacío (calles 1 y 3) o conteniendo la secuencia del *OXER1* (calles 2 y 4) se trató con las enzimas EcoRI (calles 3 y 4) o Aval (calles 1 y 2). Carril M: marcador de PM. Las mezclas de reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se tomó la imagen bajo luz UV. En rojo se marca el tamaño de los estándares de peso molecular y en verde se señalan los fragmentos obtenidos y se indican sus tamaños.

El mapa de restricción del plásmido pBABE recombinante se realizó con las enzimas EcoRI, SmaI y BamHI. La figura 12 muestra los resultados obtenidos con el ADN plasmídico de varias colonias. En el panel a se muestra el resultado del tratamiento con EcoRI del ADN proveniente de cuatro colonias. La falta de inserto evidenciada en las colonias 1 y 3 indica que se trata de colonias de bacterias no

transformadas. Por el contrario, el tratamiento del ADN de las colonias 2 y 4 con EcoRI separó el fragmento completo de aproximadamente 1,5 kb del ADNc del *OXER1* (figura 12, panel a), indicando que se trata de colonias de bacterias transformadas. Para conocer la orientación del inserto, se realizó el tratamiento del ADN plasmídico de las colonias 2 y 4 con SmaI y BamHI. El fragmento de 1247 pb (figura 12, panel b), indicador de la ubicación sentido del fragmento del ADNc del *OXER1* en el pBABE, fue generado únicamente por tratamiento del ADN proveniente de la colonia 2. Esta colonia se eligió por contener el inserto del tamaño esperado en sentido correcto para la expresión.

Las colonias de bacterias elegidas conteniendo los plásmidos pSUPER.retro.puro-*OXER1*, pRc/CMVi-*OXER1* y pBABE-*OXER1* fueron crecidas en medio LB-ampicilina. El ADN plasmídico del cultivo se purificó a mediana escala (Midipreps) para obtener cantidades significativas de los plásmidos de interés para su uso experimental.

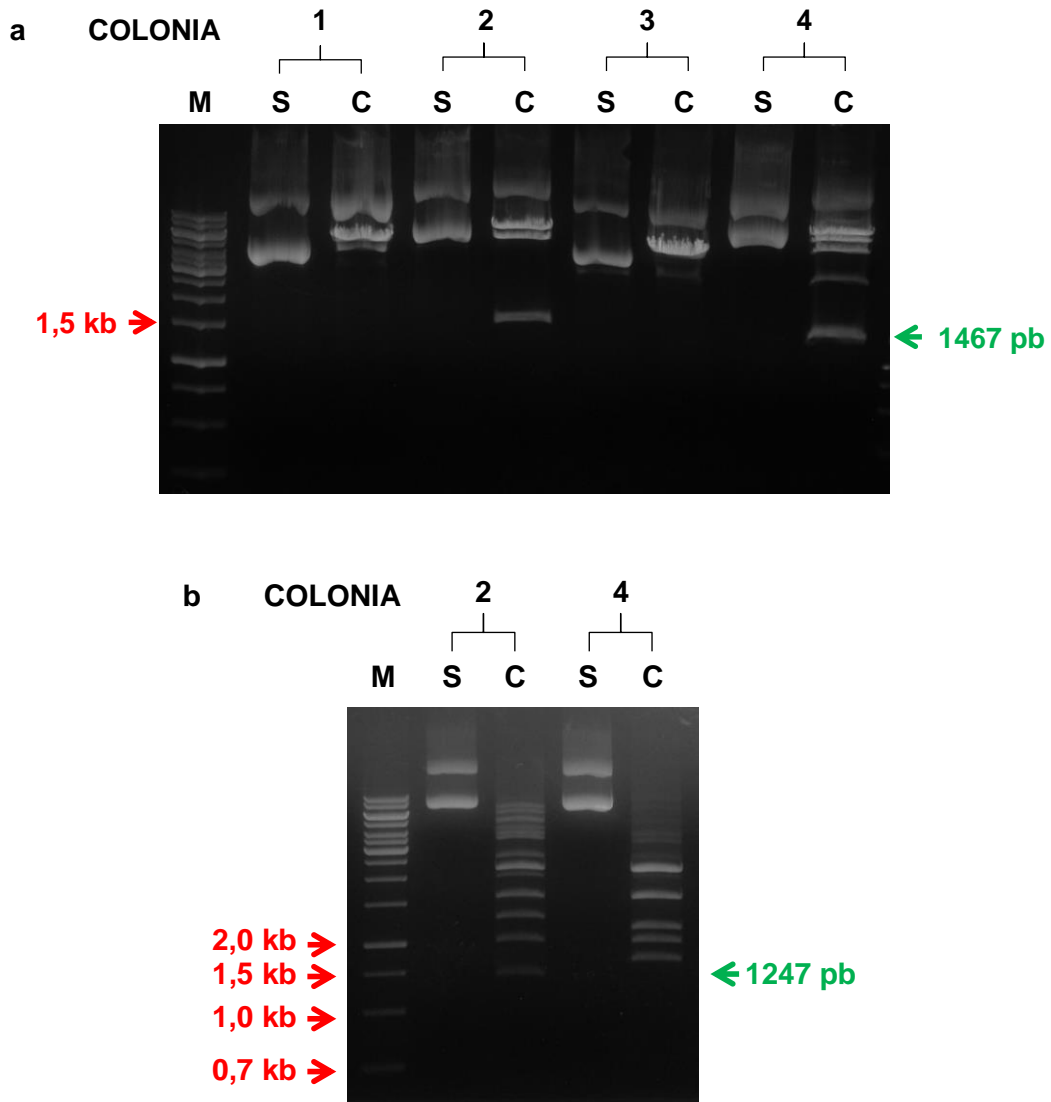


FIGURA 12: MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pBABE-OXER1

Panel a: el ADN plasmídico proveniente de 4 diferentes colonias se trató sin enzima (carriles s) y con EcoRI (carriles c).

Panel b: el ADN plasmídico proveniente de las colonias 2 y 4 del panel a se trató sin enzima (carriles s) y con SmaI y BamHI (carriles c).

Carriles M: marcador de peso molecular.

Las mezclas de reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se tomó la imagen bajo luz UV. En rojo se marca el tamaño de los estándares de peso molecular y en verde se señala el tamaño del fragmento específico.

4. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR OXER1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

Las construcciones obtenidas como se mencionó en el ítem 3 de esta sección se utilizaron para transfectar células de las líneas MA-10 y H295R, verificando luego el efecto de la transfección sobre el nivel de expresión proteica.

4.1. Silenciamiento del OXER1

El pSUPER.retro.puro conteniendo el ARNi del *OXER1* humano (pSUPER.retro.puro-*OXER1*), obtenido como se describió en el ítem 3 de esta sección, se utilizó para la transfección transitoria de las células adrenocorticales de origen humano de la línea H295R. En las transfecciones controles se utilizó el plásmido pSUPER.retro.puro-scrambled. Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen™). Luego de 48 horas de la transfección, se analizó el contenido de la proteína OXER1 en los lisados celulares. El western blot con anticuerpos comerciales específicos evidenció una señal correspondiente a la expresión endógena del OXER1 en las células H295R (figura 13, carril 1), señal que no se modificó por transfección con el plásmido control pSUPER.retro.puro-scrambled (figura 13, carril 2 vs. 1). Las células transfectadas con el pSUPER.retro.puro-*OXER1* (figura 13, carril 3 vs. 1 o 2) no mostraron modificación en la expresión del receptor comparado con la expresión endógena. Esta falta de efectividad para el silenciamiento invalidó el uso de esta construcción para experimentos funcionales.

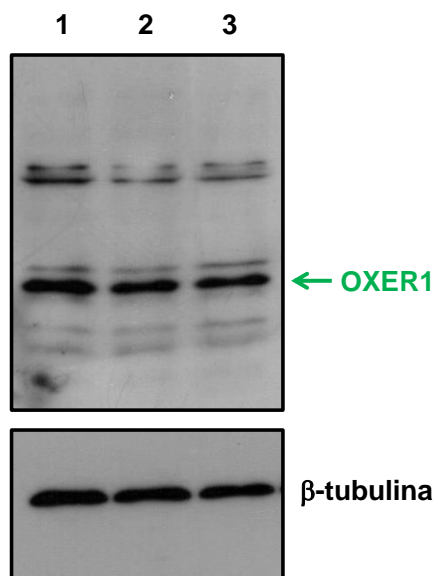


FIGURA 13: EXPRESIÓN DE OXER1 EN CÉLULAS H295R TRANSFECTADAS CON EL pSUPER.retro.puro-OXER1

Se realizó la transfección transitoria de las células H295R con el plásmido pSUPER.retro.puro-scrambled (carril 2) o pSUPER.retro.puro-OXER1 (carril 3). Se analizó el contenido de OXER1 en los lisados celulares por western blot con anticuerpos comerciales. Como control de carga, se realizó el revelado con anticuerpo anti- β -tubulina. Carril 1: lisado total de células H295R no transfectadas.

4.2. Sobreexpresión transitoria del OXER1

Primero se sobreexpresó el gen *OXER1* en células de Leydig de la línea MA-10 por medio de una transfección transitoria utilizando el pRc/CMVi conteniendo el ADNc del *OXER1* humano (pRc/CMVi-*OXER1*), obtenido como se describió en el ítem 3 de Resultados. En las transfecciones controles se utilizó el plásmido vacío (pRc/CMVi-vacío). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante (InvitrogenTM). Luego de 48 horas de la transfección, se analizó el contenido de la proteína OXER1 en los lisados celulares por western blot con anticuerpos comerciales diseñados para reconocer la forma humana de la proteína. Los resultados se muestran en la figura 14.

El análisis por western blot evidenció en los lisados de células transfectadas con el plásmido vacío una señal correspondiente a la expresión endógena del OXER1 en las células MA-10, del tamaño molecular esperado (50 kDa, figura 14, carril 1). Los

lisados de células transfectadas con el pRc/CMVi-*OXER1* (figura 14, carril 2) mostraron un incremento en la expresión del receptor comparado con la expresión endógena.

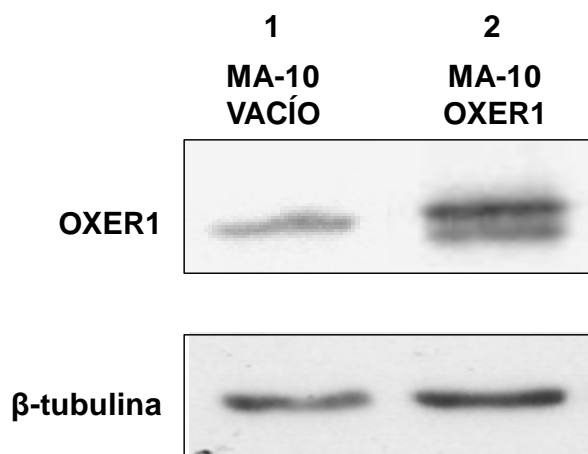


FIGURA 14: EXPRESIÓN DE OXER1 EN CÉLULAS MA-10 TRANSFECTADAS CON EL pRc/CMVi-*OXER1*

Se realizó la transfección transitoria de las células MA-10 con el plásmido pRc/CMVi vacío o conteniendo la secuencia del *OXER1*. Se analizó el contenido de *OXER1* en los lisados celulares por western blot con anticuerpos comerciales. Como control de carga, se realizó el revelado con anticuerpo anti- β -tubulina. El experimento se repitió tres veces, obteniendo similares resultados.

4.3. Sobreexpresión estable del *OXER1*

Luego se sobreexpresó el gen *OXER1* en células adrenocorticales de la línea H295R por medio de una transfección estable utilizando el pBABE conteniendo el ADNc del *OXER1* humano (pBABE-*OXER1*), obtenido como se describió en el ítem 3 de esta sección. En las transfecciones controles se utilizó el plásmido vacío (pBABE-vacío). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante (InvitrogenTM). Luego de 48 horas de la transfección, se realizó la selección de las células transfectadas utilizando higromicina, antibiótico para el cual el plásmido pBABE porta un gen de resistencia. Se utilizó una concentración de 50 μ g/ml, determinada previamente como la mínima concentración que mata a las células H295R en 7 días. El tratamiento se prolongó por 10 días y se continuó el cultivo

en ausencia del antibiótico. Así, se generaron las líneas celulares H295R-vacío y H295R-*OXER1*, correspondientes a ambas transfecciones descritas.

Luego de la selección, se analizó el contenido tanto del ARNm como de la proteína *OXER1* por RT-PCR y western blot respectivamente.

Los niveles de ARNm se determinaron como se describió en el ítem 1. Para la PCR se utilizaron oligonucleótidos iniciadores que reconocen fragmentos internos en la secuencia del *OXER1*. Estos iniciadores están remarcados en verde en la figura 4. Se amplificó también el ARNm de L19, expresión utilizada como control de carga en los geles de agarosa. La secuencia de los iniciadores para esta amplificación fue: 5'-AGTATGCTCAGGCTTCAGAA-3'/5'-TTCCTTGGTCTTAGACCTGC-3' (tamaño del amplicon 500 pb). Los productos de la reacción se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, realizados como se indican en el ítem 1 de esta sección. Los resultados se muestran en la figura 15, panel a. Las células transfectadas con el plásmido vacío revelaron una señal correspondiente a la expresión endógena del *OXER1* en las células H295R del tamaño molecular esperado (figura 15, panel a, carril 1). Los lisados de células transfectadas con el pBABE-*OXER1* mostraron un incremento en el ARNm del receptor (figura 15, panel a, carril 2).

El análisis por western blot evidenció en los lisados de células transfectadas con el plásmido vacío una señal correspondiente a la expresión endógena del *OXER1* en las células H295R del tamaño molecular esperado (50 kDa, figura 15, panel b, carril 1). Los lisados de células transfectadas con el pBABE-*OXER1* (figura 15, panel b, carril 2) mostraron un incremento en la expresión del receptor.

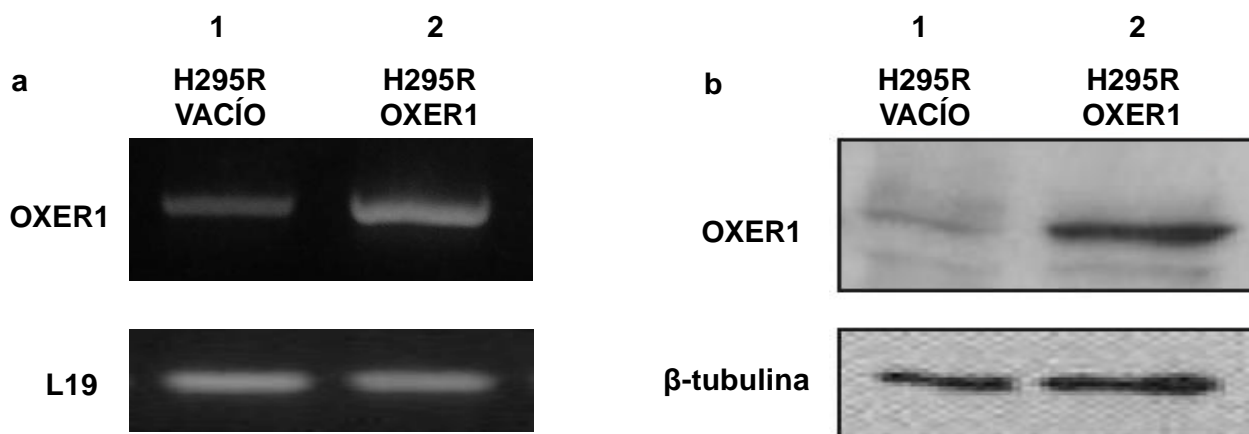


FIGURA 15: EXPRESIÓN DE OXER1 EN CÉLULAS H295R TRANSFECTADAS CON EL pBABE-OXER1

Se realizó la transfección estable de las células H295R con el plásmido pBABE vacío o conteniendo la secuencia del *OXER1*. Luego de la selección con higromicina B, se cultivaron las células resultantes H295R-vacío y H295R-*OXER1*. Se analizó el contenido del ARNm y de la proteína *OXER1*. El experimento se repitió tres veces, obteniendo similares resultados.

Panel a: se obtuvo el ARN total, se realizó la RT-PCR con iniciadores específicos (marcados en color verde en la figura 4) para el ADNc del *OXER1* y L19 como control de carga. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Panel b: se analizó el contenido de *OXER1* en los lisados celulares por western blot con anticuerpos comerciales. Como control de carga, se realizó el revelado con anticuerpo anti-β-tubulina.

5. EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DEL OXER1 EN LA FUNCIÓN DE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS

5.1. Efecto de la sobreexpresión del receptor *OXER1* sobre la esteroidogénesis en células de Leydig de la línea MA-10

Las células de Leydig de la línea MA-10 se transfectaron en forma transitoria con los plásmidos pRc/CMVi vacío o conteniendo la secuencia del *OXER1*. Luego de 48 hs. de la transfección, los cultivos se trataron en ausencia (control) y presencia de 8Br-AMPC (0,25 mM). Luego de una y dos horas de estimulación se determinó la producción de esteroides cuantificando la concentración de progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo. Los resultados se muestran en la figura 16.

La producción de esteroides por las células MA-10 transfectadas con el pRc/CMVi-vacío se incrementó luego del tratamiento con 8Br-AMPC, resultado

comparable con la estimulación de células MA-10 cepa salvaje (no mostrado). La expresión de la forma pRc/CMVi-*OXER1* incrementó significativamente la producción de progesterona estimulada por 8Br-AMPc, en comparación con el nivel de esteroides obtenido en las células transfectadas con el plásmido vacío y estimuladas también con AMPc.

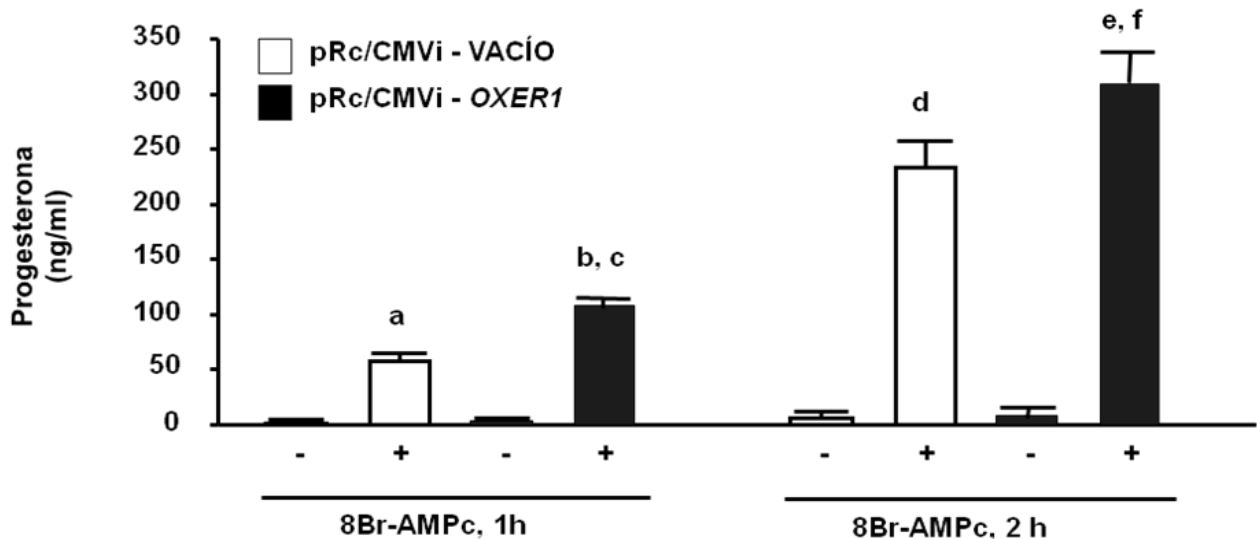


FIGURA 16: PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES EN CÉLULAS DE LEYDIG DE LA LÍNEA MA-10 QUE SOBREENEXPRESAN EL RECEPTOR *OXER1*

Se realizó la transfección transitoria de las células MA-10 con el plásmido pRc/CMVi vacío (columnas blancas) o conteniendo la secuencia del *OXER1* (columnas negras). Luego de 48 hs, los cultivos se trataron en ausencia y presencia de 8Br-AMPc (0,25 mM). Se determinó la concentración de progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo. Los resultados se expresan en ng progesterona/ml de medio como media \pm EEM de tres experimentos independientes. a, $P < 0,05$ vs. pRc/CMVi vacío, sin AMPc 1 h; b, $P < 0,001$ vs. pRc/CMVi-*OXER1*, sin AMPc 1 h; c, $P < 0,05$ vs. pRc/CMVi vacío, con AMPc 1 h; d, $P < 0,001$ vs. pRc/CMVi vacío, sin AMPc; 2 h; e, $P < 0,001$ vs. pRc/CMVi-*OXER1*, sin AMPc 2 h; f, $P < 0,001$ vs. pRc/CMVi vacío, con AMPc 2 h.

5.2. Efecto de la sobreexpresión del receptor *OXER1* sobre la expresión de la proteína StAR y sobre la esteroidogénesis en células adrenocorticales de la línea H295R

La expresión basal de la proteína reguladora StAR en las células de la línea H295R-*OXER1* se determinó por RT-PCR y western blot, evidenciando un aumento tanto en los niveles del ARNm (figura 17, panel a) como de la proteína (figura 17, panel

b, carril 4 vs. 1) comparado con el contenido en las células transfectadas con el plásmido vacío.

A continuación, se evaluaron los niveles proteicos luego del estímulo esteroideogénico. Los cultivos de las células adrenocorticales H295R-vacío y H295R-*OXER1* se trataron en ausencia (control) y presencia de 8Br-AMPC (0,5 mM) o All (10^{-8} M). Luego de 6 horas de estimulación se determinó la expresión de la proteína reguladora StAR en los lisados celulares por western blot (figura 17, panel b) y la producción de esteroides cuantificando la concentración de progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo (figura 18).

La estimulación de células H295R-vacío o H295R-*OXER1* con 8Br-AMPC o All causó el incremento ya conocido de los niveles proteicos de StAR (figura 17, panel b, carril 2 y 3 vs. 1). Sin embargo, la expresión de la proteína StAR en células H295R-*OXER1* fue mayor que en las células H295R-vacío.

La producción de esteroides por las células H295R-vacío (figura 18, barras blancas) se incrementó luego de la estimulación tanto con All como con 8-Br-AMPC, resultado comparable con la estimulación de células H295R cepa salvaje (no mostrado). Las células H295R-*OXER1* (figura 18, barras negras) incrementaron significativamente la producción de progesterona estimulada por 8Br-AMPC y All, en comparación con el nivel de esteroides obtenido en las células H295R-vacío estimuladas con el mismo agonista.

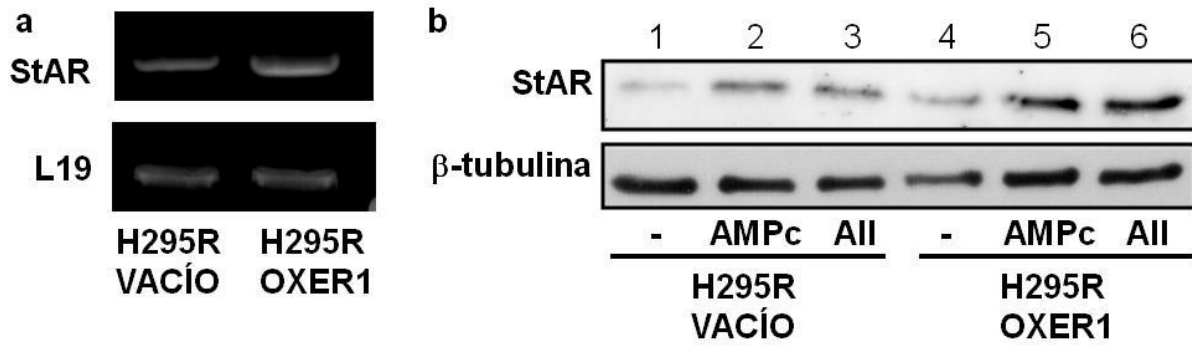


FIGURA 17: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA StAR EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES DE LA LÍNEA H295R QUE SOBREENPRESAN EL RECEPTOR OXER1

Panel a: Se obtuvo el ARN total a partir del cultivo de células H295R-vacío y H295R-OXER1 y se realizó la RT-PCR con oligonucleótidos iniciadores específicos para el ADNc de StAR y L19 como control de carga. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Panel b: Los cultivos de células H295R-vacío y H295R-OXER1 se trataron en ausencia y presencia de 8Br-AMPC (0,25 mM) o 10^{-8} M angiotensina II (All). Luego de 6 h, se obtuvieron los lisados celulares totales y se analizaron por Western blot con anticuerpos que reconocen específicamente StAR y β -tubulina.

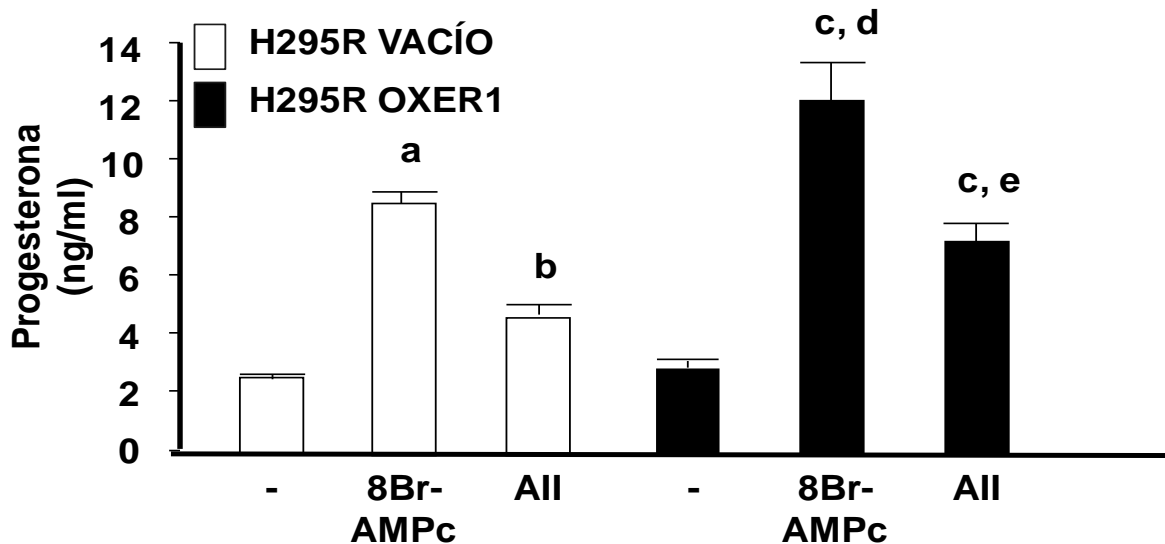


FIGURA 18: PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES DE LA LÍNEA H295R QUE SOBREENPRESAN EL RECEPTOR OXER1

Las células H295R-vacío (columnas blancas) y H295R-OXER1 (columnas negras) fueron cultivadas en ausencia y presencia de 8Br-AMPC (AMPC, 0,5 mM) y Angiotensina II (All, 10^{-8} M). Luego de 6 hs, se determinó la concentración de progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo. Los resultados se expresan en ng progesterona/ml de medio como media \pm EEM de cuatro experimentos independientes. a, $P < 0,001$ vs. H295R-vacío, sin AMPc y All; b, $P < 0,05$ vs. H295R-vacío, sin All y AMPc; c, $P < 0,001$ vs. H295R-OXER1, sin AMPc ni All; d, $P < 0,01$ vs. H295R-vacío, con AMPc; e, $P < 0,01$ vs. H295R-vacío, con All.

DISCUSIÓN

Los logros de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- la obtención de plásmidos de expresión para conseguir el aumento transitorio o estable de la expresión del OXER1,
- la obtención de la línea celular H295R-OXER1, células adrenocorticales humanas que sobreexpresan el OXER1 de forma estable y
- la verificación de la participación del OXER1 en la esteroidogénesis estimulada por dos vías de transducción de señales: la que involucra AMPc/PKA y la que involucra PLC/PKC.

La participación del receptor OXER1 en la activación de neutrófilos, eosinófilos y monocitos y en las respuestas celulares asociadas, como la formación de especies reactivas del oxígeno y la quimiotaxis, comenzó a describirse hace algunos años. Incluso un número importante de trabajos más recientes demuestran la vinculación entre la expresión de este receptor y el desarrollo de cáncer. La descripción de la participación del OXER1 en la regulación de un proceso endocrinológico realizada en este trabajo resulta novedosa. Aún cuando la participación de los metabolitos lipooxygenados del AA en la esteroidogénesis se conoce desde hace más de 3 décadas, el mecanismo de acción aún no ha sido descrito. En este trabajo aportamos conocimientos sobre un eslabón de esta cadena compleja de eventos que transcurren entre el metabolismo del AA por la 5-LOX a la regulación fina de la esteroidogénesis: identificamos al OXER1 como un componente en la estimulación hormonal de la esteroidogénesis.

El rol funcional de los derivados lipooxygenados del AA en el incremento agudo de la esteroidogénesis fue demostrado tanto en nuestro como en otros laboratorios (Cooke y col., 1991; Mele y col., 1997; Solano y col., 1987; Wang y col., 2000; Wang y col., 2003). Por otro lado, se demostró la existencia de un receptor perteneciente a la

superfamilia de receptores de 7 fragmentos transmembrana (7TMS) acoplados a proteína G para los ácidos 5-oxo-ETE, 5-HpETE y 5-HETE, derivados lipoxigenados del AA (Hosoi y col., 2002; Jones y col., 2003). Basados en estos dos grandes hallazgos, hipotetizamos que los metabolitos del AA vía la 5-LOX podrían señalar a través de su propio receptor en la regulación de la esteroidogénesis.

Las acciones biológicas del 5-oxo-HETE son mediadas por un receptor OXER1 altamente selectivo, que se expresa en una variedad de células inflamatorias (Hosoi y col., 2002; Hosoi y col., 2005) como así también en células tumorales (Sundaram y col., 2006). Aunque las funciones patofisiológicas del 5-oxo-ETE y su receptor aún no están completamente caracterizadas, ambos podrían cumplir roles importantes en el asma (Jones, 2005) y enfermedades alérgicas, cáncer (O'Flaherty y col., 2005; Sundaram y col., 2006) y enfermedades cardiovasculares (Grant y col., 2009).

En sistemas esteroidogénicos, los metabolitos lipooxigenados del AA participan en la regulación aguda de la esteroidogénesis a través de un mecanismo que involucra, al menos en parte, la acción autocrina y/o paracrina de estos compuestos. Esta conclusión se establece a partir de la identificación de 5-HpETE y 5-HETE como dos metabolitos del AA producidos como consecuencia de la activación dependiente de AMPc (Wang y col., 2003), y de la demostración de sus efectos estimulantes sobre la expresión genética de StAR y la producción de hormonas esteroides.

El efecto de los productos lipoxigenados sobre la funcionalidad de células esteroidogénicas estaría mediado por la activación del receptor de membrana OXER1. Usando herramientas farmacológicas y biotecnológicas evidenciamos que el receptor OXER1 estaría involucrado, al menos en parte, en la estimulación de la esteroidogénesis. Demostramos que el OXER1 está involucrado no solo en la acción dependiente de AMPc, sino también en la estimulación de la esteroidogénesis

estimulada por angiotensina II, hormona que actúa por una vía independiente del AMPc.

Verificamos la presencia del receptor para eicosanoides OXER1 en las células esteroideogénicas adrenocorticales H295R de origen humano. Utilizando cebadores basados en la secuencia publicada del *OXER1* y anticuerpos disponibles comercialmente, pudimos detectar el ARNm del *OXER1* y la proteína en células adrenocorticales H295R humanas.

Es necesario agregar que también se realizaron reacciones de RT-PCR en varias condiciones utilizando el ARN de células MA-10 de origen murino y los cebadores basados en la secuencia humana publicada, no logrando amplificación en ningún caso. Con respecto al western blot utilizando anticuerpos comerciales, inicialmente no fue posible revelar la banda correspondiente al OXER1 endógeno presente en este tipo celular. Se debió ensayar el western blot en varias condiciones para obtener el resultado mostrado en la figura 14. Este resultado es sumamente original dado que, como se dijo antes, el OXER1 humano no tiene secuencias con alta homología en el genoma de rata o ratón. Más aún, no existen publicaciones describiendo el gen o la proteína en estas especies. Por lo tanto, nuestro resultado sugiere la existencia de una proteína con suficiente homología para ser reconocida, en condiciones adecuadas, por anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización con la proteína humana. Sin embargo, la homología sería baja porque no encontramos condiciones para amplificar el ADNc de ratón con iniciadores diseñados en base a la secuencia humana.

Además, se evaluó el rol funcional de OXER1 utilizando como herramientas a los compuestos descritos como agonista y antagonista del receptor, 5-oxo-ETE y DHA respectivamente. El tratamiento de los cultivos de células H295R con el antagonista del

receptor produjo una disminución en la magnitud de la respuesta al estímulo con All y 8Br-AMPC. Este resultado concuerda con la disminución observada en la actividad del promotor de StAR por acción del DHA, y la consiguiente disminución de la síntesis del mensajero y la proteína correspondientes (datos no mostrados). Más aún, la esteroidogénesis estimulada por AMPC se incrementó en presencia del agonista del receptor, 5-oxo-ETE. Estas evidencias sugirieron que el metabolismo del AA por la 5-lipoxigenasa promovería la inducción de la proteína StAR y la esteroidogénesis a través del receptor de membrana OXER1.

Con el fin de identificar al receptor OXER1 como mediador de la respuesta hormonal también se modificó el grado de expresión del OXER1 en células esteroidogénicas. Para ello fue necesario producir herramientas de biología molecular generando plásmidos para el silenciamiento y para la sobreexpresión del OXER1.

Un oligonucleótido que silencia la expresión específica del OXER1 se introdujo en el plásmido pSUPER.retro.puro. El ADNc del *OXER1* obtenido de células adrenocorticales humanas H295R fue clonado en dos vectores de expresión (pRc/CMV_i y pBABE). Estas construcciones se utilizaron luego para transfectar células murinas de Leydig de la línea MA-10 o células adrenocorticales H295R de origen humano.

Se prepararon dos vectores como herramienta de sobreexpresión con el objetivo de realizar transfecciones tanto transitorias como estables. Los experimentos de transfección transitoria suelen resultar en una baja eficiencia de transfección. Si bien es posible obtener resultados en estas condiciones, para evidenciar diferencias en ciertas funciones celulares, suele ser necesario contar con una cantidad mayor de células que expresen el receptor de interés. Es por ello que realizamos también la transfección y selección para conseguir una línea celular que exprese el OXER1 en forma estable. El

plásmido pRc/CMVi-OXER1 se adecua para la transfección y expresión transitoria. El plásmido pBABE-OXER1 es apropiado para la transfección y expresión estable.

Para verificar que la transfección de estas construcciones produce la modificación deseada de los niveles de la proteína OXER1, se realizaron ensayos de western blot con anticuerpos que reconocen la forma humana del receptor.

La transfección de la construcción pSUPER.retro.puro-OXER1 en células H295R no fue efectiva para evidenciar una disminución en la expresión de la proteína. Este resultado negativo puede deberse a cuestiones técnicas. El plásmido recombinante pSUPER.retro.puro-OXER1 se construyó conteniendo un oligonucleótido de 19 bases, diseñado con herramientas informáticas. Si bien estos programas predicen secuencias de ARNi efectivos y selectivos para producir silenciamiento de una secuencia blanco determinada, la predicción es teórica y no garantiza la efectividad en un 100%. Otra explicación podría buscarse por la eficiencia de la transfección. Si el plásmido no se incorporó en suficiente cantidad de células, la expresión del gen de interés en un alto número de células no transfectadas impide evidenciar el silenciamiento que ocurre en unas pocas células transfectadas. Por lo tanto, podría ocurrir que haya baja incorporación de un fragmento poco efectivo para la disminución de la expresión del gen de interés. Si bien puede haber otros motivos no conocidos, estas explicaciones podrían justificar la falta de disminución en la expresión del *OXER1* obtenida experimentalmente al transfectar de forma transitoria con la secuencia que se diseñó informáticamente.

Con respecto a la sobreexpresión, tanto la transfección transitoria como la estable dieron el resultado esperado: aumento de los niveles de proteína en los lisados celulares en las células transfectadas con plásmidos que contienen el ADNc del *OXER1*.

En las células que sobreexpresan el gen *OXER1* se realizó la verificación del rol funcional del receptor sobre la esteroidogénesis. Se evaluó la respuesta a estímulos que actúan tanto de forma dependiente como independiente de AMPc. Para ello se utilizó directamente el análogo permeable 8Br-AMPc para activar PKA y angiotensina II que actúa activando la vía PLC/PKC. En ambos casos la sobreexpresión del receptor *OXER1* produjo un incremento significativo en la producción de progesterona, llegando a la conclusión que el *OXER1* regula la esteroidogénesis estimulada por mecanismos dependientes e independientes de AMPc.

Es de remarcar que por la transfección estable de las células H295R con el pBABE-*OXER1*, uno de los plásmidos recombinantes obtenidos en este trabajo, se obtuvieron las células H295R-*OXER1*, una línea celular esteroidogénica que tiene aumentados los niveles de expresión del receptor. La consecuencia funcional de esta modificación es el aumento en la producción de esteroides activada por estímulos que activan las vías AMPc/PKA y PLC/PKC. Esta es una herramienta novedosa y útil para el estudio detallado de la funcionalidad del *OXER1* en estas células.

En conclusión, este trabajo de Tesis de Maestría demuestra que la activación del receptor de membrana *OXER1* está involucrada en la activación de la esteroidogénesis. Los eicosanoides, productos del metabolismo del AA por la vía de la 5-lipoxigenasa, se liberarían al medio extracelular ejerciendo un efecto autócrino/parácrino sobre el receptor *OXER1*, ejerciendo así sus efectos promotores de la esteroidogénesis. Este mecanismo de acción se verifica ante la estimulación de vías de señalización que involucran tanto AMPc/PKA como PLC/PKC, resultado coincidente con el hecho que la generación y metabolización del AA es un evento común a ambas vías de transducción de señales. Este modelo se muestra en la figura 19. El estudio de los mecanismos de la cascada de señalización del *OXER1* en la regulación de la

esteroidogénesis presenta un gran desafío para futuras investigaciones. La línea celular H295R-OXER1 obtenida en este trabajo, que expresa el OXER1 en forma estable, es un sistema de estudio de gran utilidad en el futuro análisis de la transducción de señales.

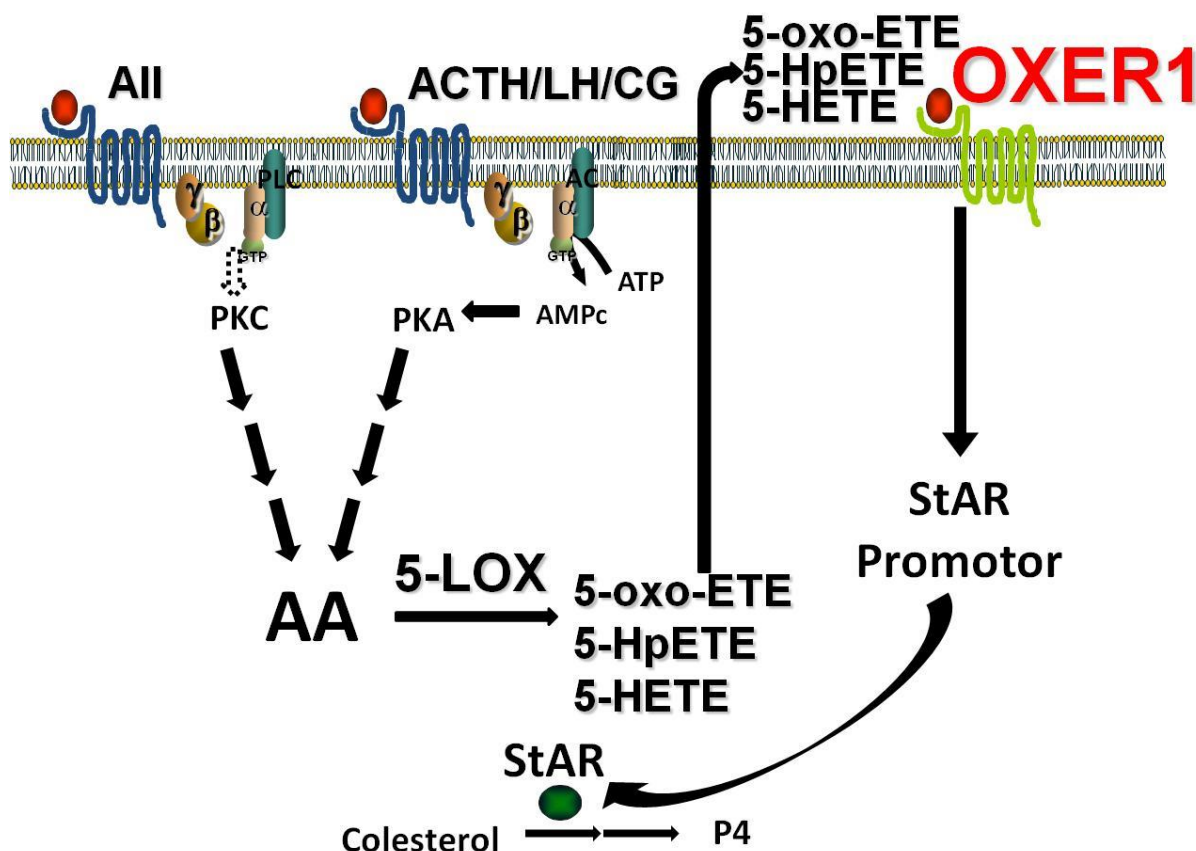


FIGURA 19: MODELO PROPUESTO DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE MEMBRANA OXER1 EN LA ACTIVACIÓN HORMONAL DE LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES

All: angiotensina II; ACTH: hormona adrenocorticotrofina; LH: hormona luteinizante; CG: hormona gonadotrofina coriónica; PLC: fosfolipasa C; AC: adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; PKC: proteína quinasa dependiente de calcio; PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc; AA: ácido araquidónico; 5-LOX: 5-lipoxigenasa; 5-HpETE: ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico; 5-HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; StAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein; P4: progesterona.

RESÚMENES

RESUMEN

La regulación hormonal de la esteroidogénesis involucra al ácido araquidónico, precursor de los productos lipoxigenados necesarios para la activación de la esteroidogénesis, independientemente del estímulo que desencadene la respuesta. En otros sistemas, está postulado que los productos lipoxigenados son secretados y que funcionarían en forma autócrina estimulando un receptor de membrana denominado OXER1 perteneciente a los receptores acoplados a proteína G y con alta afinidad por 5-oxo-ETE, 5-HpETE y 5-HETE, productos de la 5-lipoxigenasa. En base a estos antecedentes, hipotetizamos que los metabolitos del ácido araquidónico vía la 5-LOX podrían señalar a través de su propio receptor en la regulación de la esteroidogénesis. con una aproximación farmacológica, demostramos que el OXER1 estaría involucrado, al menos en parte, en la vía de transducción que involucra al AMPc/PKA.

Con el fin de identificar al OXER1 como mediador de la activación de la esteroidogénesis, inicialmente demostramos la presencia del receptor OXER1 en células esteroidogénicas humanas de la línea H295R productoras de esteroides a través de varias vías de señalización. Luego, abordamos la modificación de la actividad y de los niveles de expresión del OXER1 en células esteroidogénicas. La actividad se modificó con herramientas farmacológicas, usando un agonista y un antagonista del receptor. Estos compuestos fueron capaces de modificar la producción de esteroides por células H295R. Para los cambios en la expresión, fue necesario primero obtener herramientas de biología molecular para realizar el silenciamiento y la sobreexpresión, parte fundamental del trabajo que se presenta. Entonces, se obtuvo un plásmido pSUPER.retro.puro-OXER1 para el silenciamiento y se clonó el ADNc humano generando plásmidos de expresión transitoria y estable: pRc/CMVi-OXER1 y pBABE-OXER1, respectivamente. Con estas construcciones se transfectaron células de las líneas MA-10 de Leydig de testículo de ratón y/o células H295R adrenocorticales humanas. Solo los dos plásmidos recombinantes obtenidos para la sobreexpresión fueron aptos para el uso ya que únicamente con ellos se logró el cambio esperado de la expresión del OXER1 (ARNm y/o proteína). Para analizar la funcionalidad del OXER1 sobreexpresado, determinamos el efecto de la transfección de ambos plásmidos sobre la producción de esteroides tanto en células MA-10 como H295R. La estimulación de estas células por agonistas que activan vías de señalización que involucran tanto AMPc/PKA como PLC/PKC resultó en un aumento en la esteroidogénesis cuando se sobreexpresa el OXER1. Este trabajo entonces aporta evidencia de la participación del receptor de membrana OXER1 en la activación de la producción de esteroides. Otro aporte relevante de este trabajo es que la transfección de células H295R

adrenocorticales humanas generó células que expresan en forma estable al OXER1. Esta nueva línea celular, H295R-OXER1, es un sistema de estudio de gran utilidad en el futuro análisis de la transducción de señales iniciada por la activación del receptor.

ABSTRACT

Hormonal regulation of steroidogenesis involves arachidonic acid, precursor of the lipoxxygenated products necessary for activation of steroidogenesis, irrespective of the stimulus that triggers the response. In other systems, it is postulated that lipoxxygenated metabolites of arachidonic acid are secreted and they would act in an autocrine fashion stimulating a membrane receptor called OXER1. This protein belongs the G protein-coupled receptors with high affinity for 5-oxo-EETE, 5-HPETE and 5- HETE, products of 5-lipoxxygenase. Based on this background, we hypothesized that the metabolites of arachidonic acid via the 5-LOX could signal through their own receptor in the regulation of steroidogenesis. In order to identify OXER1 as mediator of the activation of steroidogenesis, initially, we demonstrated the presence of OXER1 receptor in H295R human steroidogenic cells. Then, we modified the activity and the expression of OXER1 in steroidogenic cells. The activity was pharmacologically modified, using an agonist and an antagonist of the receptor. These compounds were able to modify steroid production by H295R cells. In order to modify the expression levels, first we needed to obtain molecular biology tools. So, a specific RNAi was introduced in a pSUPER.retro.puro plasmid and the human cDNA was cloned in pRc/CMVi and pBABE. MA-10 Leydig mouse testis cells and/or H295R human adrenocortical cells were transfected with these constructions. Only the two recombinant plasmids obtained for overexpression were functional as only in these cases the expected change in OXER1 expression (mRNA and/or protein) was achieved. To verify the performance of overexpressed OXER1, we determined the effect of transfection of both plasmids on steroid production in both MA-10 and H295R cells. The stimulation of these cells by agonists that activate signaling pathways that involve both cAMP/PKA and PLC/PKC resulted in an increase in steroidogenesis when OXER1 was overexpressed. Thus, here we presented evidence for the involvement of the membrane receptor OXER1 in the activation of steroid production. Another important contribution of this work is that transfection of cells H295R human adrenocortical cells generated cells that stably express the OXER1. This new cell line, H295R-OXER1, will be a useful tool in future analysis of the signal transduction pathways involved in the activation of the receptor.

BIBLIOGRAFÍA

- Arakane, F, King, SR, Du, Y, Kallen, CB, Walsh, LP, Watari, H, Stocco, DM y Strauss, JF, 3rd. 1997. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* **272** 32656-32662.
- Artemenko, IP, Zhao, D, Hales, DB, Hales, KH y Jefcoate, CR. 2001. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* **276** 46583-46596.
- Ascoli, M. 1981. Characterization of Several Clonal Lines of Cultured Leydig Tumor Cells: Gonadotropin Receptors and Steroidogenic Responses. *Endocrinology* **108** 88-95.
- Ausubel, F, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA y Struhl, K 1995 *Short Protocols in Molecular Biology - A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bird, IM, Hanley, NA, Word, RA, Mathis, JM, McCarthy, JL, Mason, JI y Rainey, WE. 1993. Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* **133** 1555-1561.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254.
- Caron, KM, Soo, SC, Wetsel, WC, Stocco, DM, Clark, BJ y 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 U S A* **94** 11540-11545.
- Cingolani, HE y Houssay, AB 2000 *Fisiología Humana de Houssay - 7ª Edición*. Buenos Aires: Editorial El Ateneo.
- Clark, BJ y Stocco, DM. 1996. StAR-A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **7** 227-233.
- Clark, BJ, Wells, J, King, SR y Stocco, DM. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* **269** 28314-28322.
- Cooke, BA, Dirami, G, Chaudry, L, Choi, MS, Abayasekara, DR y Phipp, L. 1991. Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40** 465-471.
- Crivello, JF y Jefcoate, CR. 1980. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem* **255** 8144-8151.
- Cho, Y-Y, Kang, M-J, Ogawa, S, Yamashita, Y, Fujino, T y Yamamoto, TT. 2000. Regulation by Adrenocorticotropin Hormone and Arachidonate of the Expression of Acyl-CoA Synthetase 4, an Arachidonate-Preferring Enzyme Expressed in Steroidogenic Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **274** 741-745.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.
- Epstein, LF y Orme-Johnson, NR. 1991. Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* **266** 19739-19745.
- Finkielstein, C, Maloberti, P, Mendez, CF, Paz, C, Cornejo Maciel, F, Cymeryng, C, Neuman, I, Dada, L, Mele, PG, Solano, A y Podesta, EJ. 1998. An adrenocorticotropin-regulated phosphoprotein intermediary in steroid synthesis is similar to an acyl-CoA thioesterase enzyme. *Eur J Biochem* **256** 60-66.
- Gazdar, AF, Oie, HK, Shackleton, CH, Chen, TR, Triche, TJ, Myers, CE, Chrousos, GP, Brennan, MF, Stein, CA y La Rocca, RV. 1990. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **50** 5488-5496.
- Geneser, F 2000 *Histología - 3ª Edición*: Editorial Medica Panamericana.
- Granot, Z, Geiss-Friedlander, R, Melamed-Book, N, Eimerl, S, Timberg, R, Weiss, AM, Hales, KH, Hales, DB, Stocco, DM y Orly, J. 2003. Proteolysis of Normal and Mutated

- Steroidogenic Acute Regulatory Proteins in the Mitochondria: the Fate of Unwanted Proteins. *Molecular Endocrinology* **17** 2461-2476.
- Grant, GE, Rokach, J y Powell, WS. 2009. 5-Oxo-EETE and the OXE receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89** 98-104.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166** 557-580.
- Havelock, JC, Rainey, WE y Carr, BR. 2004. Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* **228** 67-78.
- Hosoi, T, Koguchi, Y, Sugikawa, E, Chikada, A, Ogawa, K, Tsuda, N, Suto, N, Tsunoda, S, Taniguchi, T y Ohnuki, T. 2002. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem* **277** 31459-31465.
- Hosoi, T, Sugikawa, E, Chikada, A, Koguchi, Y y Ohnuki, T. 2005. TG1019/OXE, a G α (i/o)-protein-coupled receptor, mediates 5-oxo-eicosatetraenoic acid-induced chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* **334** 987-995.
- Jones, CE. 2005. The OXE receptor: a new therapeutic approach for asthma? *Trends Mol Med* **11** 266-270.
- Jones, CE, Holden, S, Tenailon, L, Bhatia, U, Seuwen, K, Tranter, P, Turner, J, Kettle, R, Bouhelal, R, Charlton, S, Nirmala, NR, Jarai, G y Finan, P. 2003. Expression and characterization of a 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid receptor highly expressed on human eosinophils and neutrophils. *Mol Pharmacol* **63** 471-477.
- Kang, MJ, Fujino, T, Sasano, H, Minekura, H, Yabuki, N, Nagura, H, Iijima, H y Yamamoto, TT. 1997. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 2880-2884.
- Khan, WA, Blobe, GC y Hannun, YA. 1995. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal* **7** 171-184.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- Leibiger, H, Wustner, D, Stigler, RD y Marx, U. 1999. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J* **338** 529-538.
- Lieberman, MA, Marks, A y Peet, A 2012 *Mark's Basic Medical Biochemistry - A clinical approach*: Wolters Kluwer.
- Lin, D, Sugawara, T, Strauss, JF, 3rd, Clark, BJ, Stocco, DM, Saenger, P, Rogol, A y Miller, WL. 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* **267** 1828-1831.
- Maloberti, P, Lozano, RC, Mele, PG, Cano, F, Colonna, C, Mendez, CF, Paz, C y Podesta, EJ. 2002. Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *Eur J Biochem* **269** 5599-5607.
- Maloberti, P, Maciel, FC, Castillo, AF, Castilla, R, Duarte, A, Toledo, MF, Meuli, F, Mele, P, Paz, C y Podesta, EJ. 2007. Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* **265-266** 113-120.
- McPhail, LC, Clayton, CC y Snyderman, R. 1984. A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science* **224** 622-625.
- Mele, PG, Dada, LA, Paz, C, Neuman, I, Cymeryng, CB, Mendez, CF, Finkielstein, CV, Cornejo Maciel, F y Podesta, EJ. 1997. Involvement of arachidonic acid and the lipoxygenase pathway in mediating luteinizing hormone-induced testosterone synthesis in rat Leydig cells. *Endocr Res* **23** 15-26.
- Murakami, K y Routtenberg, A. 1985. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca²⁺. *FEBS Lett* **192** 189-193.
- Neuman, I, Lisdero, C, Finkielstein, C, Maloberti, P, Mendez, CF, Poderoso, JJ y Podesta, EJ. 1999. Activation of a thioesterase specific for very-long-chain fatty acids by adrenergic agonists in perfused hearts. *Biochim Biophys Acta* **1451** 101-108.

- Neuman, I, Maloberti, P, Lisdero, C, Colonna, C, Peralta, J, Jose, JP y Podesta, EJ. 2002. beta-Adrenergic stimulation controls the expression of a thioesterase specific for very-long-chain fatty acids in perfused hearts. *Biochem Biophys Res Commun* **299** 135-141.
- O'Flaherty, JT, Rogers, LC, Paumi, CM, Hantgan, RR, Thomas, LR, Clay, CE, High, K, Chen, YQ, Willingham, MC, Smitherman, PK, Kute, TE, Rao, A, Cramer, SD y Morrow, CS. 2005. 5-Oxo-ETE analogs and the proliferation of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1736** 228-236.
- Poderoso, C, Converso, DP, Maloberti, P, Duarte, A, Neuman, I, Galli, S, Maciel, FC, Paz, C, Carreras, MC, Poderoso, JJ y Podesta, EJ. 2008. A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS ONE* **3** e1443.
- Pollack, SE, Furth, EE, Kallen, CB, Arakane, F, Kiriakidou, M, Kozarsky, KF y Jerome F. Strauss, I. 1997. Localization of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Human Tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82** 4243-4251.
- Rainey, WE, Bird, IM y Mason, JI. 1994. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol* **100** 45-50.
- Rainey, WE, Saner, K y Schimmer, BP. 2004. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* **228** 23-38.
- Schimmer, BP, Kwan, WK, Tsao, J y Qiu, R. 1995. Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor. *J Cell Physiol* **163** 164-171.
- Schimmer, BP y Tsao, J. 1984. Isolation of forskolin-resistant adrenal cells defective in the adenylate cyclase system. *J Biol Chem* **259** 5376-5379.
- Solano, AR, Dada, LA, Luz Sardanons, M, Sanchez, ML y Podesta, EJ. 1987. Leukotrienes as common intermediates in the cyclic AMP dependent and independent pathways in adrenal steroidogenesis. *J Steroid Biochem* **27** 745-751.
- Stocco, DM. 2001. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* **15** 1245-1254.
- Stocco, DM y Clark, BJ. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* **17** 221-244.
- Sundaram, S y Ghosh, J. 2006. Expression of 5-oxoETE receptor in prostate cancer cells: critical role in survival. *Biochem Biophys Res Commun* **339** 93-98.
- Towbin, H, Staehelin, T y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** 4350-4354.
- Wang, X, Walsh, LP, Reinhart, AJ y Stocco, DM. 2000. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J Biol Chem* **275** 20204-20209.
- Wang, XJ, Dyson, MT, Jo, Y, Eubank, DW y Stocco, DM. 2003. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85** 159-166.