

Tesis Doctoral

Mecanismos involucrados en la inducción del gen de HO-1 en células adrenales. Efecto de ACTH, NO y LPS

Astort, Francisco

2012

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Astort, Francisco. (2012). Mecanismos involucrados en la inducción del gen de HO-1 en células adrenales. Efecto de ACTH, NO y LPS. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Astort, Francisco. "Mecanismos involucrados en la inducción del gen de HO-1 en células adrenales. Efecto de ACTH, NO y LPS". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos involucrados en la inducción del gen
de HO-1 en células adrenales. Efecto de ACTH,
NO y LPS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Autor: Lic. Francisco Astort

Directora de tesis: Prof. Dra. Cora Beatriz Cymeryng

Consejero de estudios: Prof. Dr. Omar Adrián Coso

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Endocrinología Molecular,
Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires. CEFYBO-CONICET.

Buenos Aires, 2012

Mecanismos involucrados en la inducción del gen de HO-1 en células adrenales.

Efecto de ACTH, NO y LPS

La actividad de HO-1 ha sido asociada a una plétora de efectos biológicos. En particular estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado su rol como modulador autócrino/parácrino de la esteroidogénesis en la corteza adrenal de ratas estimuladas con ACTH [1] y LPS [2], así como su acción citoprotectora como parte del sistema antioxidante adrenal.

En el presente trabajo de tesis estudiamos mecanismos de inducción de HO-1 en células adrenales. Los resultados obtenidos confirman que el tratamiento de células Y1 con ACTH induce la transcripción de HO-1. Se localizó una zona del promotor murino de HO-1 de 400 pb aledaña al inicio de la transcripción, donde se encontraron secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción CREB y AP-1. Se demostró también la participación de la vía de transducción de señales de AMPc/PKA/CREB y de Akt/PKB en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH.

El LPS incrementó la transcripción de HO-1 por un mecanismo que involucra una zona del promotor de aprox. 516 pb (entre -3216 y -2700). Tras el estímulo con LPS constatamos, además, la activación del factor de transcripción NFκB y la regulación de la expresión de HO-1 por la vía de la PKA.

Finalmente, encontramos evidencias que nos permiten afirmar que el NO también induce a la HO-1 incrementando su transcripción, por un mecanismo que involucra la activación del factor de Nrf2, la actividad de PKC, la activación de la GCs y la generación de GMPc.

En suma, demostramos que diferentes estímulos son capaces de activar la transcripción de HO-1, en células adrenales Y1, utilizando diferentes mediadores y factores de transcripción. Dado su rol modulador en la síntesis de glucocorticoides adrenales además de sus efectos citoprotectores, este conocimiento podría utilizarse para diseñar estrategias dirigidas a inducir HO-1 como un blanco novel alternativo en el tratamiento de patologías que cursan con disfunción adrenal.

Palabras claves: HO-1; ACTH; adrenal; LPS; NO; AMPc; PKA; CREB; Nrf2; ROS; GCs; NFκB; NADPHox; MAPKs; Akt/PKB; promotor; esteroidogénesis.

Mechanisms involved in the induction of HO-1 gene in adrenal cells. Effects of ACTH, NO and LPS

HO-1 activity has been involved in a plethora of biological effects. In particular, previous studies from our group have demonstrated an autocrine/paracrine modulatory role in steroidogenesis in the adrenal cortex of the rat under the stimulation of ACTH [1] or LPS [2]. In addition, HO-1 induction was shown to exert a citoprotective effect in these cells [1].

Present studies were designed to analyze different mechanisms of HO-1 induction in adrenal cells. Our results confirm that ACTH treatment of Y1 adrenal cells results in an increase in the transcription of the HO-1 gene. Results showed a 400 bp zone of the murine HO-1 promoter near the initiation of the transcription site housing consensus sequences for the binding of CREB and AP-1. The involvement of the cAMP/PKA/CREB and Akt/PKB transduction pathways in ACTH-induced regulation of the HO-1 gene was also demonstrated.

HO-1 transcription was also increased by LPS, and this effect was dependent on the presence of a ~516 bp zone in the murine promoter (between -3216 y -2700 bp). LPS-dependent HO-1 gene induction was mediated by the activation of the NFκB transcription factor. The modulation of this pathway by PKA was also demonstrated.

Finally, we also showed that NO also increased HO-1 mRNA expression levels through the activation of Nrf2, PKC, and sGC with the resulting production of cGMP.

In summary we demonstrated that different stimuli are able to induce HO-1 in the murine adrenocortical cell line Y1, using several signaling pathways that ultimately activate this enzyme's gene by means of different transcription factors. Considering its role as a modulator of adrenal glucocorticoid synthesis, in addition to its cytoprotective effects, this knowledge could be used to design strategies aimed at inducing HO-1 as a novel alternative target in the treatment of diseases that presents with adrenal dysfunctions.

Key words: HO-1; ACTH; adrenal; LPS; NO; AMPc; PKA; CREB; Nrf2; ROS; GCs; NFκB; NADPHox; MAPKs; Akt/PKB; promoter; steroidogenesis.

Agradecimientos

A mi mamá Susana por haberme dado todo.

A mi hermana Ana por compartir conmigo su simpleza.

A mi hermano Fede por ser ejemplo de perseverancia y rigurosidad.

A Martin y a Camila que me acompañaron en todo este recorrido.

A Rocio y a Memi porque están dispuestas siempre a dar una mano.

A Elian, Juan Martin, Julián por los momentos y experimentos compartidos.

A todo el NROE por ser parte esencial de mi formación.

A Fabiana, Paula, Hernan del HRDC por la ayuda con las células y las transfecciones.

A Andy, Caro y Florencia por los reactivos, el trabajo en el cuarto de cultivo.

Al CEFYBO, instituto en el cual desarrolle mis actividades doctorales y a su gente que siempre me ayudo cuando lo necesite.

Al CONICET que ha sido mi sustento económico durante el lapso completo del doctorado y lo será en mi post-doc.

A la Facultad de Medicina por brindar el espacio.

A la gente de Exactas: Omar, Sol, Daiana por los consejos y los plásmidos.

A Elba y sus becarios por su colaboración y las herramientas facilitadas.

A Adalí, Diego, Dieguito, Luciana por compartir materiales y saberes.

A Gerardo por enseñarme algunos secretos del laboratorio.

A Carla por permitirme la experiencia de trabajar en otro país.

A Pablo por los conocimientos compartidos y sus acertadas correcciones.

A Cora por ayudarme a crecer como estudiante, biólogo y científico, por recibirme y acompañarme en el inicio de un camino que recién comienza.

A Erika, mi compañera de vida, la persona que más amo en este planeta.

A Susana A. Lemoine y a Esteban D. Astort, mi madre y mi padre.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas con referato:

- LIPOPOLYSACCHARIDE STIMULATES ADRENAL STEROIDOGENESIS IN RODENT CELLS BY A NFkB-DEPENDENT MECHANISM INVOLVING COX-2 ACTIVATION. Martinez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, Sanchez R, Pignataro O, Arias P, Cymeryng CB. Mol Cell Endocrinol. 2011 Apr 30; 337(1-2):1-6.

- HIGH GLUCOSE-INDUCED CHANGES IN STEROID PRODUCTION IN ADRENAL CELLS F. Astort, E.M. Repetto, C. Martínez Calejman, J.M. Cipelli, R. Sánchez, J.M. Di Gruccio, M. Mercau, O.P. Pignataro, P. Arias, C. B. Cymeryng. Diabetes Metab Res Rev. 2009 Jul; 25(5):477-86.

- HO-1 IS INDUCED BY ACTH VIA CREB ACTIVATION IN ADRENAL CELLS. F. Astort, María Mercau, Camila Martinez Calejman, Rocío Sanchez, Pablo Arias y Cora B. Cymeryng. Manuscrito en preparación

Presentaciones en Congresos Nacionales:

Congresos de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Buenos Aires.

- (2011) EL OXIDO NÍTRICO INDUCE LA HEMO OXIGENASA-1 EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES MURINAS DE LA LÍNEA Y1. Astort F; Mercau M E; Cymeryng B

- (2009) ANÁLISIS DEL MECANISMO DE INDUCCIÓN DE HO-1 POR ACTH EN CÉLULAS ADRENALES. Astort F; Mercau M; Martinez Calejman C; Repetto EM; Pecci A.; Cymeryng CB.

- (2008) EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS y SISTEMAS ANTIOXIDANTES ADRENALES. F. Astort, E.M. Repetto, C. Martinez Calejman, M Mercau, J Cipelli, P. Arias y C.B. Cymeryng

- (2007) EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS ADRENAL, IMPLICANCIAS DE ROS Y SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE NO Y CO. F. Astort, E.M. Repetto, C. Martinez Calejman, M Mercau, M Besio Moreno, O Pignataro y C.B. Cymeryng

Presentaciones en Congresos Internacionales

- (2010) SISTAM: The First South American Spring Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine” (SISTAM2010) 24th and 28th of October. Los Cocos, Cordoba, Argentina. NITRIC OXIDE INDUCES HO-1 IN ADRENOCORTICAL CELLS. Francisco Astort, María Mercau, Camila Martinez Calejman, Martín Repetto, Pablo Arias and Cora B. Cymeryng

- (2009) Heme oxygenases in Biology and medicine. 6th International Congress on Heme Oxygenases. Miami Beach, Florida. Sept 30th- October 4th. LPS INDUCES HO-1 IN ADRENOCORTICAL CELLS. Francisco Astort; Camila Martinez Calejman; María Mercau; Esteban M. Repetto; Pablo Arias; Cora B. Cymeryng.

Abreviaturas

ACTH: hormona adrenocorticotrofina

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AP-1: proteína activadora 1

CO: monóxido de carbono

CREB: *cAMP response element-binding protein*

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

CYP: citocromo

DETA/NO: dietilentriamina NO

DTNB: 5-5'-ditiobis [ácido 2-nitrobenzoico]

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

GC: glucocorticoide

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPx: glutatión peroxidasa

GSH/GSSG: glutatión reducido/oxidado

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HHA: hipotálamo-hipófiso-adrenal

HO: hemo oxigenasa

JNK: quinasas del N-terminal de c-Jun

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido bacteriano

L-NAME: N γ -nitro-L-arginina-metil éster

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MC2R: receptor de melanocortina tipo 2

NF κ B: factor nuclear *kappa* B

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

Nrf2: factor 2 relacionado a NF-E2

ONOO $^-$: peroxinitrito

PI3K: fosfoinosítido 3-quinasa

PKA, PKB, PKC y PKG: proteína quinasa A, B, C y G

POMC: pro-opiomelanocortina

PPIX: protoporfirina IX

RNS: especies reactivas del nitrógeno

ROS: especies reactivas del oxígeno

SAPK: proteína quinasa activable por estrés

GCs: guanilato ciclasa soluble

Sn-PPIX: estaño-protoporfirina IX

SOD: superóxido dismutasa

SR-BI: receptor scavenger clase B tipo I

StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

STZ: estreptozotocina

TBA: ácido tiobarbitúrico

TSPO: proteína translocadora de la membrana mitocondrial externa

ZF: *zona fasciculata*

ZG: *zona glomerulosa*

ZR: *zona reticularis*

Índice

1- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1- La glándula adrenal	1
1.2- Esteroidogénesis adrenal	3
1.3- La línea celular Y1	5
1.4- Mecanismo de acción del ACTH	6
1.5- El lipopolisacárido bacteriano	7
1.6- El óxido nítrico	9
1.7- Estrés oxidativo y nitrosativo	12
1.8- El sistema hemo oxigenasa	14
1.9- Mecanismos de inducción de HO-1	16
<u>OBJETIVOS</u>	21
2- <u>MATERIALES Y METODOS</u>	23
2.1 - Reactivos	23
2.2 - Líneas celulares	23
2.3 - Extracción de ARN total	24
2.4 - RT-PCR	24
2.5 - PCR	25
2.6 - PCR en tiempo real	25
2.7 - Obtención de proteínas totales	26
2.8 - Determinación de la concentración de proteínas	26
2.9 - Inmunoblot	27
2.10 - Determinación de niveles de lipoperóxidos	27
2.11 - Glutación reducido	28
2.12 - Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	28
2.13 - Actividad de catalasa	28

2.14	- Transfección de células Y1	29
2.15	- Construcciones plasmídicas	29
2.16	- Determinación de la actividad enzimática de los reporteros	30
2.17	- Transfección de siRNAs	31
2.18	- Viabilidad celular	31
2.19	- Producción de esteroides	31
2.20	- Estadística	32

RESULTADOS

3-	Participación de HO-1 en la regulación de la esteroidogénesis adrenal	34
4-	Efecto del ACTH sobre la expresión de HO-1	36
4.1-	Actividad del promotor de HO-1	36
4.2-	Rol del factor de transcripción CREB	37
4.3-	Generación de estrés oxidativo por ACTH	45
4.4-	Factores de transcripción dependientes del estado redox celular	47
4.5-	Rol de las MAPKs	49
4.6-	Rol de la vía Akt/PKB	51
5-	Efecto del LPS sobre la expresión de HO-1	55
5.1-	Inducción de HO-1 por LPS	55
5.2-	Actividad del promotor de HO-1	57
5.3-	Participación de la vía NF- κ B	59
5.4-	Participación de la vía AMPc/PKA/CREB	62
5.5-	Participación del estrés oxidativo	62
5.6-	Participación de MAPKs	65
6-	Efecto del Óxido Nítrico sobre la expresión de HO-1	67
6.1-	Inducción de HO-1 por DETA/NO	67
6.2-	Efecto del DETA/NO sobre la actividad del promotor de HO-1	69

6.3- Parámetros de estrés oxidativo	71
6.4- Participación del factor de transcripción	73
6.5- Inducción de genes de detoxificación de fase II	75
6.6- Participación de los factores de transcripción CREB y NFκB	76
6.7- Vías de transducción de señales	77
6.71- Vía de PKC	77
6.72- Vía del Ca ²⁺	78
6.73- Cascadas de MAPKs	79
6.74- Vía de PI3K	79
6.75- Vía del GMPc	79
7- <u>DISCUSIÓN</u>	83
7.1- Participación de HO-1 en la regulación de la esteroidogénesis	83
7.2- Inducción de HO-1 por ACTH	84
7.3- Inducción de HO-1 por LPS	90
7.4- Inducción de HO-1 por Óxido Nítrico	94
7.5- Conclusiones finales	100
8- <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	102

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1- La glándula adrenal

La glándula adrenal es un órgano endócrino par, combinación de dos entidades funcionales de origen embriológico diferente. La corteza, que comprende el 80-90% de la glándula, deriva del tejido mesodérmico y es la fuente de hormonas esteroideas. La médula que se origina a partir de células neuroectodérmicas del ganglio simpático y produce catecolaminas (Figura 1).

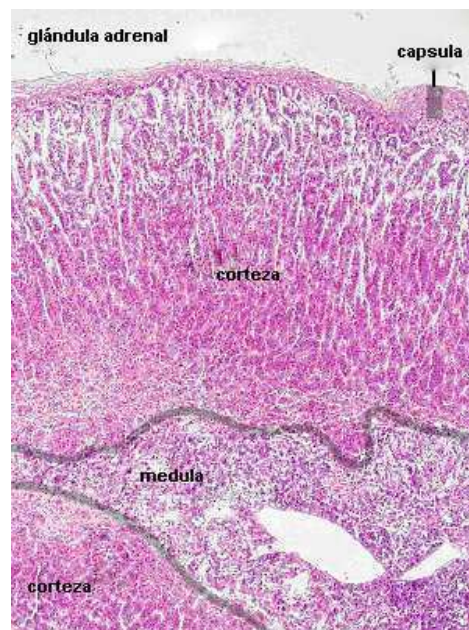


Figura 1: Corte histológico transversal de la glándula adrenal. En ella se observa una capa de tejido conectivo externo; la cápsula y más internamente la corteza, que se encuentra rodeando la médula.

Las glándulas adrenales en mamíferos están localizadas en el retroperitoneo sobre el riñón y reciben sangre arterial proveniente de la aorta, de las arterias renales y de las arterias frénicas (Figura 2).

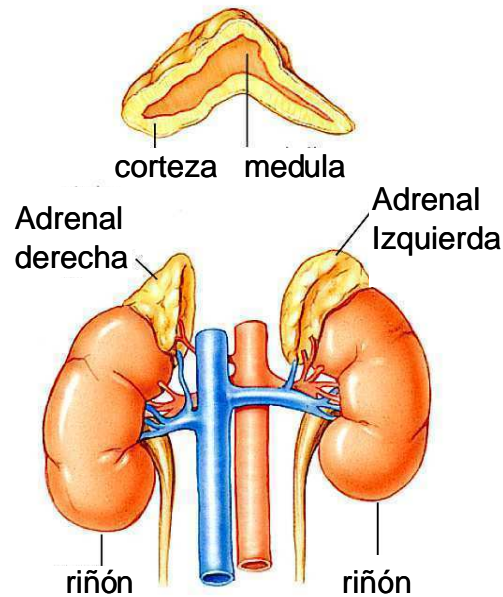


Figura 2: Localización de la glándula adrenal con respecto al riñón.

La corteza adrenal se divide en tres zonas histológica y funcionalmente diferentes que se disponen de forma concéntrica rodeando a la médula. Estas tres regiones son la zona glomerulosa (ZG), la zona fasciculata (ZF) y la zona reticularis (ZR). En un corte transversal de la glándula se observa en el exterior una cubierta de tejido conectivo, denominada cápsula, compuesta de fibras de colágeno paralelas a la superficie del órgano. Hacia el interior se encuentra la capa más delgada, la ZG, cuyas células son más pequeñas que las de la ZF, están débilmente unidas formando racimos y sintetizan mineralocorticoides. La ZF es la más extensa y está constituida por células columnares que forman cordones y que contienen gran cantidad de vacuolas lipídicas en su citoplasma. Es la zona donde se sintetizan los glucocorticoides. La ZR es la más interna, contiene redes celulares con menor cantidad de gotas lipídicas y es allí donde se producen andrógenos y también, en menor medida glucocorticoides (Figura 3).

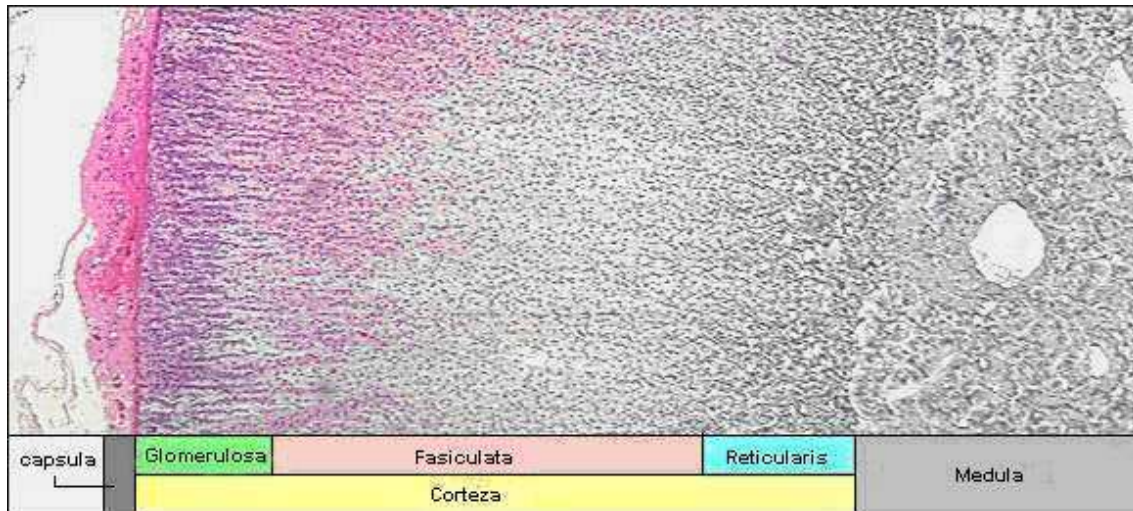


Figura 3: Corte histológico transversal de la glándula adrenal. La Figura muestra en detalle las tres zonas de la corteza.

De acuerdo a esta descripción histológica clásica existe una diferenciación funcional de la glándula en una corteza productora de esteroides, cuyas zonas están claramente delimitadas, y una médula central productora de catecolaminas.

1.2- Esteroidogénesis adrenal

La corteza adrenal es un tejido esteroidogénico en el que diferentes zonas sintetizan distintos esteroides como respuesta a diferentes estímulos. La esteroidogénesis en las ZF y ZR está regulada principalmente por la hormona hipofisaria adrenocorticotrofina (ACTH) mientras que en la ZG, el principal estímulo para la síntesis de esteroides es la angiotensina II y el K^+ , y en menor medida la ACTH.

El precursor de todas las hormonas adrenocorticales es el colesterol que es provisto principalmente por las lipoproteínas plasmáticas. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) interactúan con receptores específicos de membrana que reconocen a la apoproteína B100 ubicada en la capa exterior fosfolipídica. Luego de su endocitosis se libera el colesterol, que es esterificado y almacenado en vacuolas citoplasmáticas. Por otro lado, es sabido que las células esteroidogénicas pueden captar colesterol esterificado de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) luego de su interacción con el receptor SR-BI [3]. Las células adrenales también sintetizan colesterol *de novo*, pero la contribución de esta vía es cuantitativamente menor. En condiciones basales, las hormonas esteroideas se sintetizan principalmente a partir del colesterol del plasma. Sin

embargo, cuando la producción de corticosteroides es estimulada, el colesterol almacenado es el precursor más importante [4].

La mayoría de las reacciones de síntesis de hormonas esteroideas involucra a las enzimas citocromo P450, complejos de oxigenasas que catalizan reacciones de hidroxilación y que se localizan en la membrana mitocondrial interna y en el retículo endoplasmático (Figura 4).

En la ZF, la unión de ACTH a su receptor, acoplado a una proteína Gs, produce la activación de la adenilato ciclasa y consecuentemente el aumento en los niveles de AMPc, su segundo mensajero principal. Este mecanismo desencadena efectos inmediatos, como la fosforilación de proteínas mediada por la PKA y también un aumento de la transcripción de genes que codifican para las enzimas involucradas en la esteroidogénesis.

La etapa limitante en la síntesis de esteroides es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna, donde ocurre el primer paso enzimático de la vía. La regulación de la síntesis se ejerce fundamentalmente en esta etapa, demostrándose la participación de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) y de la proteína translocadora (18 kDa, TSPO), entre otras, en el mecanismo de acción de ACTH [5-7]. Por otra parte el ACTH aumenta tanto el tamaño como la complejidad funcional de las organelas, y el tamaño y el número de las células del tejido [8].

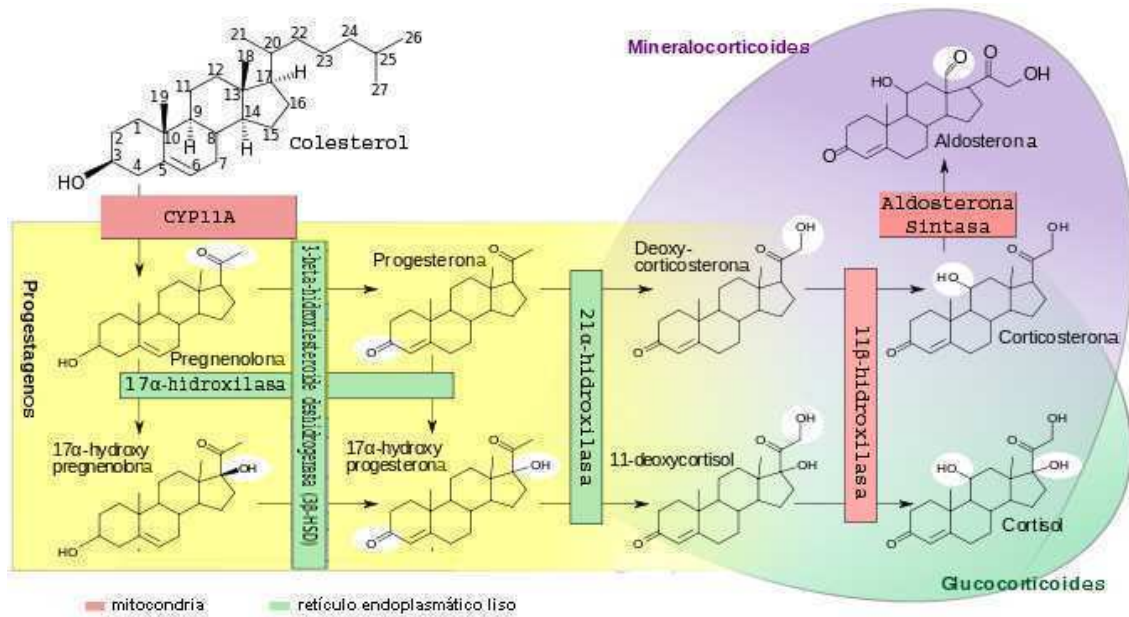


Figura 4: Localización subcelular de las reacciones involucradas en la biosíntesis de esteroides adrenales (David Richfield y Mikael Häggström).

1.3- La línea celular Y1

La línea celular Y1, desarrollada por Yasamura *et al* [9], fue originada a partir de un tumor de corteza adrenal de ratón, y clonada luego de su adaptación a las condiciones de cultivo. Las células en cultivo crecen en monocapa y poseen una morfología similar a la de las células epiteliales.

Las células Y1 se comportan en forma semejante a las células adrenales murinas normales en varios aspectos: 1) tienen la capacidad de concentrar colesterol y ácido ascórbico en su citoplasma tomándolo del medio de cultivo, 2) sintetizan Δ^4 -3-ceto- C_{21} -esteroides, principalmente 20- α -hidroxiprogesterona y 11 β -20 α -dihidroxi progesterona a partir de colesterol y secretan estos productos al medio y 3) responden al estímulo de ACTH incrementando la esteroidogénesis entre 4 y 10 veces [10].

El mecanismo de acción del ACTH involucra la síntesis de AMPc y la activación de la PKA, en forma semejante a lo que ocurre en las células normales de la corteza adrenal. En presencia de una dosis máxima de la hormona, estas células producen $3,7 \pm 0,13$ microgramos de Δ^4 -3-ceto- C_{21} -esteroides por miligramo de proteínas por hora [9, 10].

1.4- Mecanismo de acción del ACTH

La unión de ACTH a su receptor MC2R (de la familia de 7TMS) de la membrana plasmática de las células adrenales, desencadena la activación de las vías de transducción de señales de AMPc/PKA, de PKC y de otras quinasas y factores de transcripción que actúan como intermediarios en la acción de ACTH en este tejido [11].

Los efectos genómicos de ACTH están mediados principalmente por la vía que involucra al AMPc y PKA, la cual incluye a los factores de transcripción dependientes de AMPc: CREM (*cAMP responsive element modulator*) y CREB (*cAMP responsive element binding protein*). Su activación resulta en la transcripción de enzimas esteroideogénicas y en la proliferación y diferenciación celular [12].

Se ha demostrado que ACTH también es un activador de las MAPKs [11]. Esta vía participa de las respuestas celulares al estrés regulando la expresión génica, la proliferación celular y la apoptosis. Se han identificado tres subfamilias de MAPKs: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), quinasas del N-terminal de c-Jun (JNK) y p38 quinasas (p38). Estas quinasas (MKs) se activan por fosforilación de sus residuos treonina o tirosina catalizadas por las MKKs, que a su vez son fosforiladas y activadas por otras quinasas (MKKKs). En particular, la activación de ERK 1/2 es mediadora de los efectos mitóticos desencadenados por el ACTH [11] y de la activación por fosforilación del factor de transcripción SF-1. Este factor está involucrado en la inducción por ACTH de las enzimas esteroideogénicas P450_{scc} (CYP11A1), P450_{c17} (CYP17A1), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 21-hidroxilasa (CYP21A2) y 11 β-hidroxilasa (CYP11B1) como así también de otras proteínas involucradas en la vía de señalización tales como el receptor de ACTH MC2R y la proteína StAR [13]. ACTH también estimula la activación de JNK por un mecanismo dependiente de PKC y de la movilización de Ca²⁺ intracelular [14]. La activación de las vías de MAPKs lleva a la estimulación de la transcripción de Fos y Jun, heterodímeros del complejo AP-1, también asociada a la acción del ACTH. Estas proteínas forman hetero- u homodímeros que inducen la transcripción a través de su unión a los sitios de AP-1. La activación de esta vía lleva a la inducción, entre otras, de diversas proteínas que participan de la mitosis y su inhibición lleva al arresto del ciclo celular en la fase de transición G1-S [15, 16].

1.5- El lipopolisacárido bacteriano

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Está compuesto por tres elementos estructurales: un centro de oligosacárido, una cadena de antígeno-O y el lípido A (Figura 5). Entre los tipos celulares que clásicamente se han descrito como activables por LPS se pueden mencionar a los monocitos y los macrófagos, que producen como respuesta mediadores proinflamatorios.

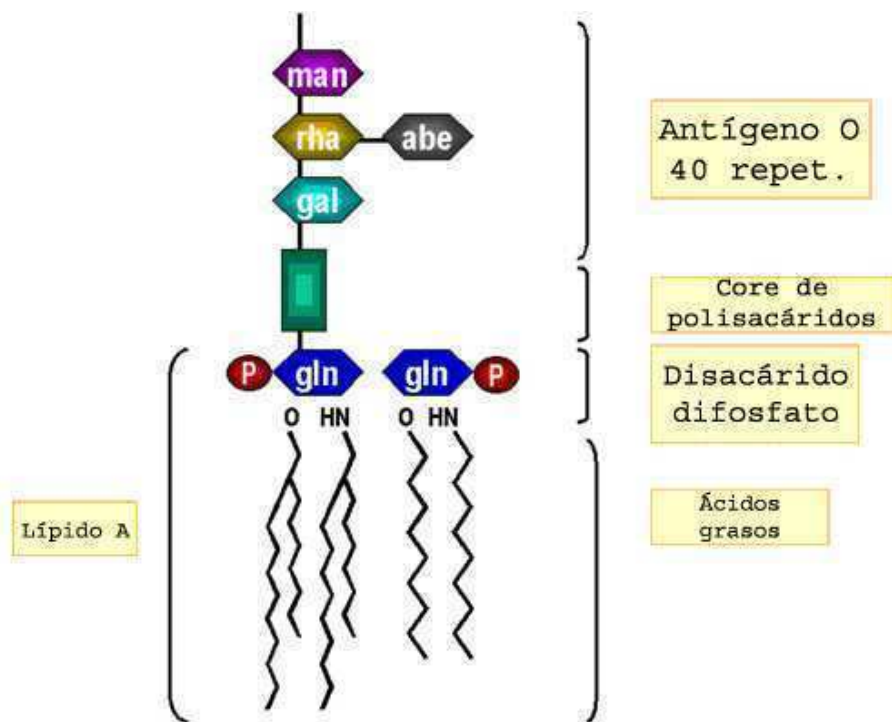


Figura 5: Estructura química del lipopolisacárido de la pared de las bacterias Gram negativas.

El LPS actúa mediante su unión a los receptores de membrana TLR-4 (*toll-like receptor 4*) y en menor medida a receptores TLR-2 por un mecanismo que involucra su interacción con la proteína de unión al LPS (LBP) que es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado y que reconoce a la región del lípido A del LPS. El complejo formado (LPS: LBP) es reconocido por el receptor de membrana (antígeno) CD14, lo que permite entonces transferir al LPS al complejo receptor compuesto por TLR-4 y la proteína MD-2. Esta interacción ocasiona la activación de dos vías de señalización diferentes, conocidas como la vía de MyD88 y la de TRIF, dependiendo de la proteína adaptadora asociada al receptor [17, 18]. Estas vías pueden o no converger,

dependiendo de las moléculas que se activan en cada tipo celular (Figura 6). Por ejemplo, la utilización de cualquiera de las vías resulta en la activación del factor de transcripción NFκB, un regulador central de las respuestas a LPS, citoquinas y estrés en muchos tipos celulares, incluyendo a los macrófagos [17, 18]. En cambio, la activación de la vía independiente de MyD88 (TRIF) puede desencadenar la activación, además de NFκB, de la familia de factores de transcripción IRF. En esta familia de factores se encuentra IRF3 que está involucrado en la inducción de INF-β entre otros genes [18].

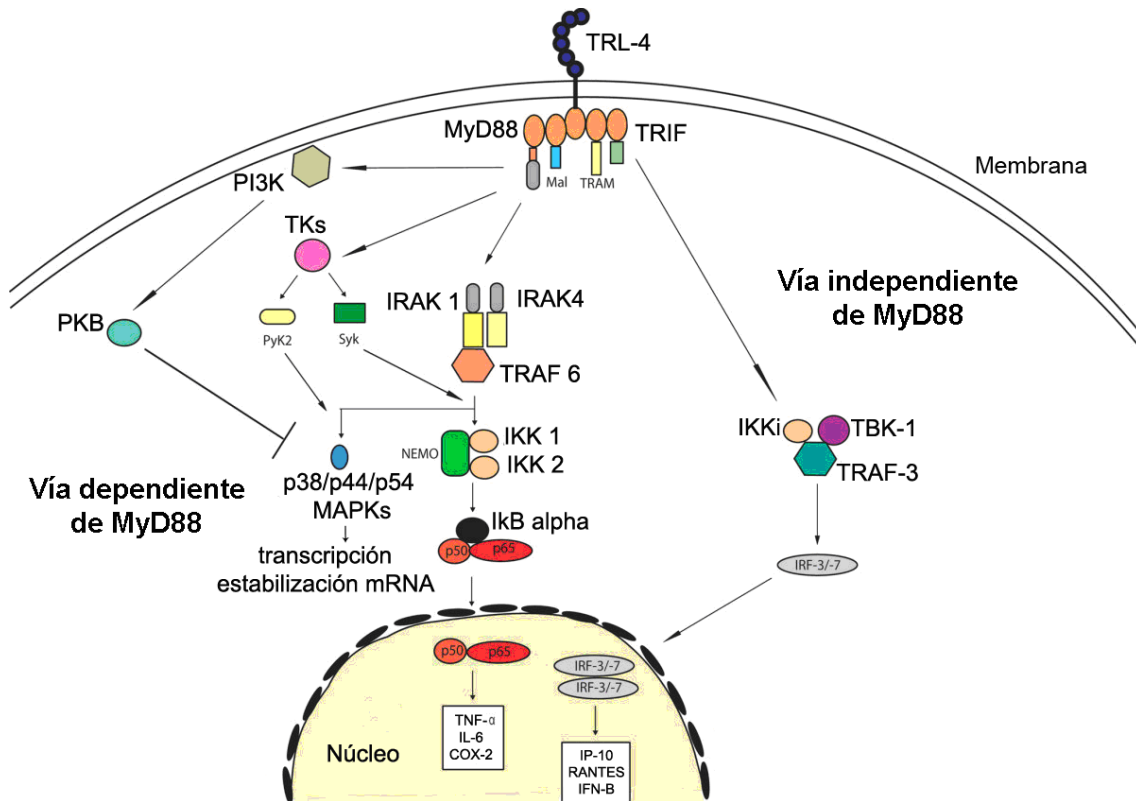


Figura 6: Esquema de la cascada de transducción de señales desencadenada por la unión de LPS al TRL-4 y activación de las vías de MyD88 y TRIF en macrófagos [19].

La familia del factor nuclear κB (NFκB, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) es una de las más estudiadas en vertebrados ya que es clave en el control de la respuesta inmune innata y adaptativa. Desde su descubrimiento se ha demostrado su participación en una amplia variedad de procesos, incluyendo inflamación, supervivencia celular, proliferación y diferenciación [20]. Esta familia de factores de transcripción está formada por cinco miembros: p105 (procesada constitutivamente a p50), p100 (procesada a p52 en condiciones finamente reguladas), p65 (también conocido como RelA), RelB y c-Rel. Estas subunidades forman homo y

heterodímeros para configurar el factor de transcripción NFκB. Este factor se une a secuencias de consenso NFκB (5'-GGGRNYYYCC-3') presentes en las regiones promotoras de una gran cantidad de genes [20].

Muchos estímulos activan NFκB, incluyendo citoquinas, activadores de proteína quinasa C, virus, estrés oxidativo y LPS. En las células estimuladas se gatillan cascadas de señalización que convergen en la activación de quinasas específicas (quinasa de IκB o IKK). En las células que no han sido estimuladas, NFκB se encuentra en el citoplasma unido a sus inhibidores IκB (IκBα, IκBβ, IκBε). A través de la activación de IKK se produce la fosforilación de IκB, siendo posteriormente ubiquitinada y degradada por el proteosoma. La degradación de IκB permite la liberación de NFκB y su desplazamiento al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN. El complejo IKK posee dos subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, y una subunidad regulatoria llamada “modulador esencial de NFκB” (NEMO), la que transduce la señal de activación a las subunidades catalíticas [21, 22].

Las principales cascadas de señalización involucradas en los efectos de LPS son las de NFκB, MAPK y PI3K/Akt [23, 24]. Estas vías culminan en la estimulación de la transcripción de diversos genes entre los que se encuentran, TNF-α, IL-6, COX-2, citoquinas pro-inflamatorias, y en la inducción de otros sistemas como los de las óxido nítrico sintasas (NOS) y hemo oxigenasas (HO) [2, 19, 24, 25]. A modo de ejemplo, el grupo de Perrella demostró la activación del promotor de HO-1 y su inducción por LPS en macrófagos, por una vía que involucra la participación del factor de transcripción Ets-2, involucrado en la regulación de la respuesta inmune, y la vía PI3K [26, 27]. En monocitos, en cambio, se ha descrito que el LPS induce HO-1 a través de la activación de la PKC y del factor de transcripción Nrf2 por un mecanismo que involucraría estrés oxidativo [28].

1.6- El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas diatómico y un radical libre altamente reactivo. Sus características químicas le permiten su interacción con metales de transición y con otros radicales, las dos especies que pueden donarle electrones para completar su orbital de unión.

Debido a su corta vida media, su naturaleza lipofílica y su bajo peso molecular, el NO atraviesa rápidamente las membranas biológicas, ejerciendo sus efectos en la

célula donde es producido y en células vecinas. Los efectos biológicos del NO dependen entonces del tipo celular, de la actividad de la enzima que lo sintetiza y de su sitio de síntesis.

El NO ejerce efectos bifuncionales en la supervivencia celular. Mientras que a altas concentraciones se considera citotóxico, a concentraciones relativamente bajas promueve la citoprotección y supervivencia celulares.

A bajos niveles, el NO reacciona con los iones metálicos de los grupos hemo de las enzimas guanilato ciclasa soluble (GCs), citocromo C oxidasa, citocromo P450 y la misma NOS. La GCs se ha descrito clásicamente como un blanco del NO. Su activación lleva a un incremento en los niveles de GMPc y a la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) y de la ADP ribosil ciclasa, un reconocido inductor de la liberación de Ca^{+2} [29].

Por otro lado, como se discutirá más adelante, se ha demostrado que el NO es capaz de activar al factor de transcripción Nrf2 y se ha sugerido que este mecanismo media los efectos de citoprotección del NO [30].

A concentraciones más altas, el NO se combina con otras especies oxidantes para formar las especies reactivas del nitrógeno (RNS), que pueden dañar una variedad de blancos celulares incluyendo al ADN y a las proteínas y en última instancia inducir mutagénesis y/o llevar a la apoptosis celular.

El óxido nítrico (NO) se sintetiza por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina en una reacción en la que se genera además L-citrulina y que requiere NADPH y oxígeno molecular (Figura 7) [31, 32].

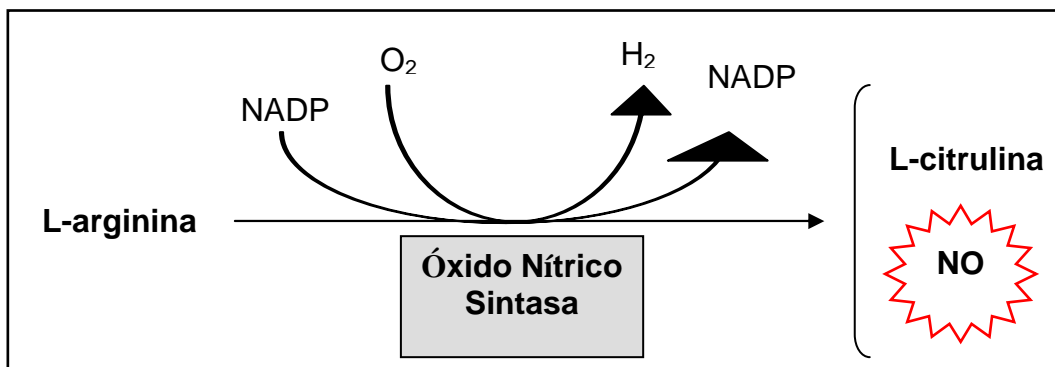


Figura 7: Esquema de la síntesis de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa.

Se ha demostrado que el NO generado por la isoforma neuronal de la NOS (NOS1) cumple un rol en la regulación de la transmisión neuronal, la liberación de neurotransmisores, el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la regulación de la expresión génica [31]. También se ha comprobado su participación en la regulación de la función sexual masculina [32] y en el control neuroendócrino del eje hipotálamo-hipofisario [33].

El NO generado por la isoforma endotelial de la NOS (eNOS o NOS 3) está involucrado principalmente en la regulación del tono vascular y la agregación plaquetaria [34]. En este sentido se ha observado que una desregulación en la producción de NO está asociada a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares.

Si bien las isoformas nNOS y eNOS fueron clasificadas como “constitutivas”, se ha demostrado ampliamente que la expresión de ambas puede variar en respuesta a determinados estímulos. En particular, la expresión de nNOS puede ser modificada por hipoxia, cambios en el nivel de luz ambiental, estrés y daño tisular, hormonas esteroideas y otros factores [35].

En macrófagos y otros tipos celulares, el NO es producido por la actividad de la isoforma iNOS inducida por LPS, interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina-1 β (IL-1 β) y otras citoquinas. El NO generado en altas concentraciones por la actividad de la iNOS puede producir daño tisular, inflamación y muerte celular [36, 37].

En trabajos previos de nuestro laboratorio se han identificado ambas isoformas “constitutivas” de NOS en la zona fasciculata de la corteza adrenal de rata y se ha detectado la expresión de la iNOS (NOS-2) en la corteza adrenal de ratas inyectadas con LPS [2, 38]. En la línea celular adrenocortical murina Y1 se ha detectado la isoforma eNOS (NOS-3) en condiciones basales y la expresión de iNOS (NOS-2) luego del tratamiento con medio condicionado de macrófagos estimulados con LPS [25].

En cuanto a la función del NO en la corteza adrenal hemos demostrado que el NO es un modulador de la esteroidogénesis adrenal: dadores de NO [39] y L-arginina [40] disminuyen significativamente la síntesis de esteroides en este tejido por un mecanismo que es independiente de la formación de GMPc y que implica la interacción del NO con citocromos P450_{scc}. En forma análoga se ha demostrado que el NO inhibe la esteroidogénesis en células de la granulosa, luteales y de la línea de células de Leydig MA-10 tanto como en células Leydig de ratas estimuladas con hCG [41, 42]. De acuerdo a éstas evidencias, hemos postulado al NO como un modulador autócrino y/o

parácrino de la fisiología adrenal [38]. Finalmente, hemos demostrado que el tratamiento *in vivo* con LPS genera un incremento en la actividad y expresión de iNOS y sugerimos que el incremento concomitante en la producción de NO está involucrado en la inducción de HO-1 en la corteza adrenal de rata [2].

1.7- Estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo/nitrosativo se define como la consecuencia de un exceso en la formación o una insuficiencia en los sistemas de protección contra los efectos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Los ROS incluyen a los radicales libres como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (HO^\bullet), el peróxido (RO_2^\bullet) y el hidropéroxido (HRO_2^\bullet) y otras especies, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HClO). Los RNS incluyen radicales libres como el óxido nítrico (NO^\bullet) y el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) así como también el peroxinitrito (ONOO^-), el ácido nitroso (HNO_2) y alquil peroxinitratos (RONOO^\bullet).

Entre las moléculas reactivas, las más importantes y más estudiadas por sus efectos biológicos son el anión superóxido (O_2^-), el óxido nítrico (NO^\bullet) y el peroxinitrito (ONOO^-) [43]. El anión superóxido es producido normalmente en el citoplasma por la reducción parcial del oxígeno. Este proceso es mediado por la actividad de distintas enzimas incluyendo a la NAD(P)H oxidasa, xantino oxidasa, ciclooxigenasa y eNOS (solo en bajas concentraciones de L-arginina). También se genera anión superóxido en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En condiciones normales, el anión superóxido es eliminado mediante la actividad de enzimas antioxidantes ya que es sustrato de la superóxido dismutasa que lo transforma en H_2O_2 (Cu ó Zn-SOD, en el citoplasma, y Mn-SOD, en las mitocondrias). Consecutivamente, el H_2O_2 es convertida en H_2O y O_2 en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa citosólica (GSH-Px) o por la catalasa en peroxisomas [44]. El H_2O_2 también puede generar el radical HO^\bullet en presencia de elementos de transición como el hierro o el cobre (Figura 8).

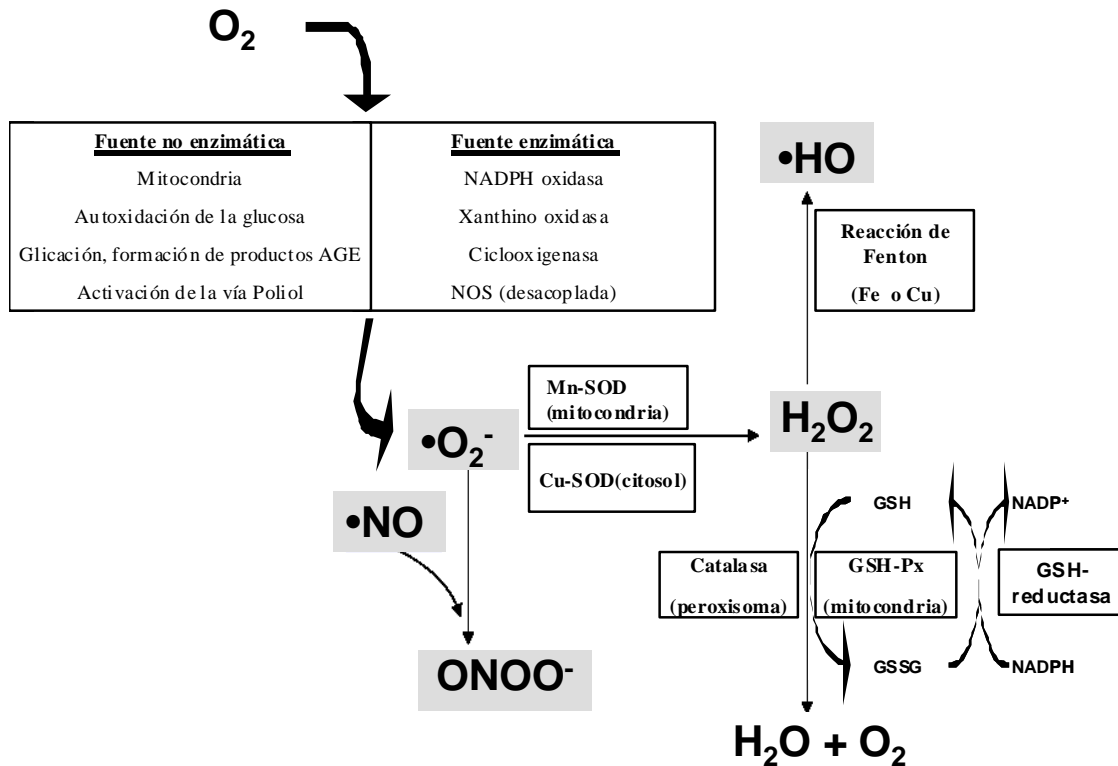


Figura 8: Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el metabolismo celular. Se resaltan en gris las principales ROS y RNS y sus posibles orígenes y destinos metabólicos. Recuadradas se pueden ver las enzimas que intervienen en las reacciones indicadas [44].

El producto de oxidación del NO, el ion nitrosonio (NO^+), puede reaccionar con los grupos tioles de los residuos cisteínas de las proteínas produciendo su S-nitrosilación. También debe considerarse la reactividad del producto de reducción del NO, el anión nitroxilo (NO^-) que puede reaccionar con tioles, oxígeno y diversos oxidantes para generar otras RNS. Por lo tanto cada una de estas formas redox puede producir diferentes respuestas biológicas dependiendo de su concentración y localización, de la presencia de tioles y de la composición del microambiente celular [45]. En forma adicional, el NO reacciona con el anión superóxido para generar el potente agente oxidante peroxinitrito (ONOO^-), que provoca la nitración en tirosina de proteínas [29]. A su vez, el peroxinitrito puede reaccionar con el GMPC para formar 8-nitro-GMPC, una molécula con propiedades oxidantes capaz de modificar proteínas [46] (Figura 9).

El sistema redox GSH/GSSG mantiene las proteínas celulares en estado reducido. En condiciones normales la forma cuantitativamente más importante del glutatión es la reducida (GSH), mientras que solo el 2% se encuentra en su forma oxidada (GSSG). Normalmente, las proteínas S-nitrosiladas son rápidamente reducidas

por el GSH, que puede ser S-nitrosilado para formar nitrosoglutation (GSNO). Los GSNO pueden, a su vez, transferir en NO hacia otros tioles proteicos [47]. En la Figura 8 se resumen los derivados del NO y sus efectos sobre blancos celulares.

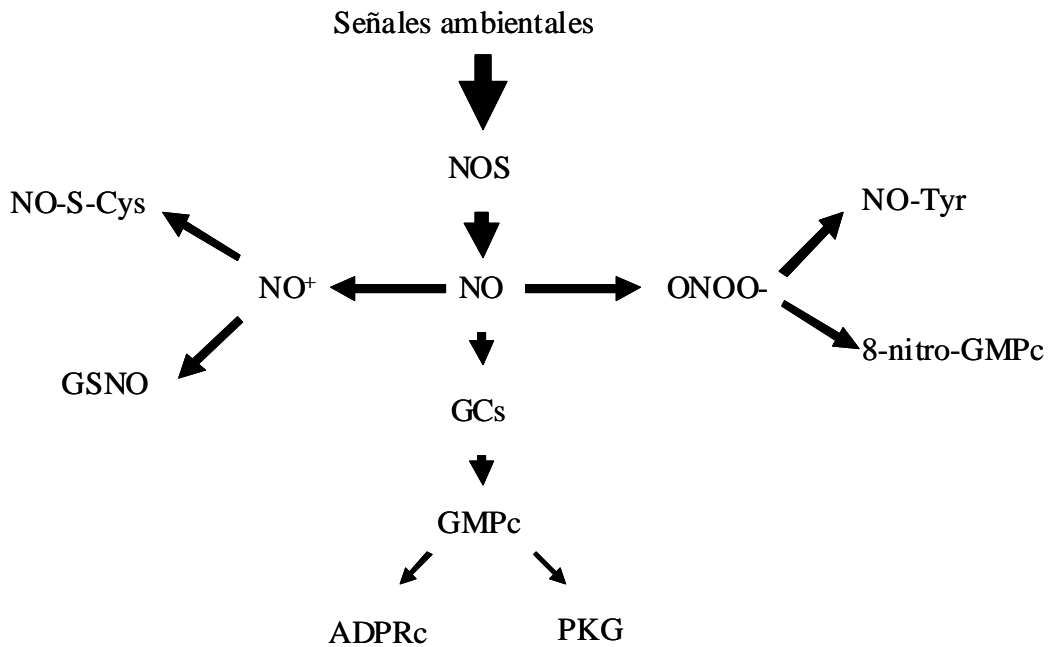


Figura 9: Esquema del mecanismo de acción del óxido nítrico.

1.8- El sistema hemo oxigenasa

La enzima hemo oxigenasa (HO) se ha descrito clásicamente como una enzima microsomal que cataliza la síntesis de monóxido de carbono (CO) por clivaje oxidativo del hemo en presencia de O₂ y de NADPH-citocromo P450 reductasa (CPR), produciendo además biliverdina y Fe³⁺ (Figura 10).

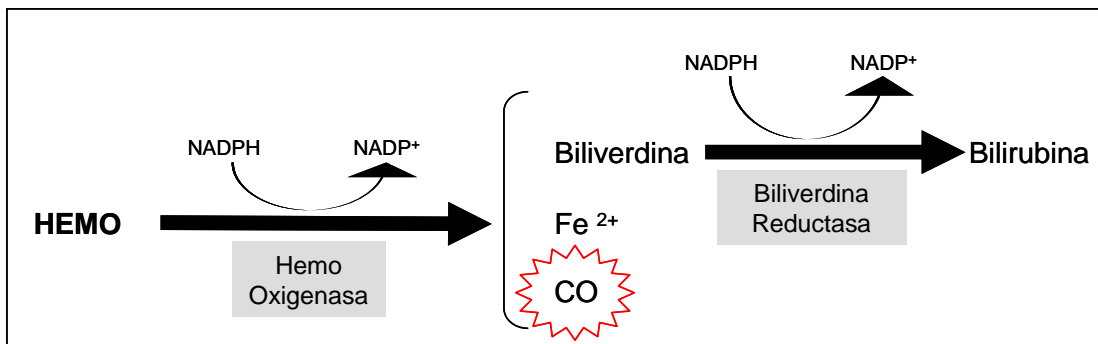


Figura 10: Catabolismo del grupo hemo por el sistema de Hemo Oxigenasa

El sistema de HO fue descrito y caracterizado por primera vez por Tenhunen *et al* en 1968. [48]. Al presente, se han identificado tres isoformas de HO producto de distintos genes: una inducible (HO-1) y dos constitutivas (HO-2 y HO-3) [49, 50]. Se ha demostrado que ambas, HO-1 y HO-2 catalizan la degradación del hemo, y la función más probable de la HO-3, dada su baja actividad enzimática sería la de unirse al hemo como biosensor. Por técnicas de inmunolocalización se ha demostrado que la enzima HO-2 se expresa constitutivamente en diversos tejidos, incluyendo cerebro y sistema nervioso, hígado, riñón, vasculatura y testículos [51, 52]. La HO-1, también conocida como HORASP32 (proteína de *shock* térmico de 32kDa), está presente en condiciones normales en hígado y bazo, donde participa de la degradación del hemo de la hemoglobina. No obstante, puede observarse un aumento de su expresión en una amplia variedad de tejidos frente a estímulos estresantes como metales pesados, *shock* térmico, disminución de los niveles de glutatión reducido, radiación UVA, endotoxinas y citoquinas, hipoxia, hiperoxia, dadores de NO y peroxinitrito, y su propio sustrato, hemo [53]. Ciertamente parece no haber sistema enzimático que responda a tanta variedad de agentes y condiciones como lo hace el de la HO-1.

Numerosas evidencias experimentales han llevado a proponer que la inducción de HO-1 es parte de un mecanismo de defensa celular y tisular frente a situaciones de estrés. Entre ellas, podemos citar los estudios realizados en ratones knock-out para la HO-1, los cuales son más sensibles al daño causado por LPS y además exhiben pobre tolerancia al estrés oxidativo (por peróxido de hidrógeno, hemina y endotoxina), anormalidades severas en el crecimiento, anemia, daño endotelial y deposición de hierro hepático y renal [54]. Un fenotipo similar se observa en la deficiencia de HO-1 humana, con marcado retardo del crecimiento, anemia y sensibilidad extrema a los oxidantes [55].

En general, la función protectora de la HO-1 se atribuye a un aumento del metabolismo del hemo, una molécula pro-oxidante, y a la producción concomitante de los poderosos antioxidantes biliverdina y bilirrubina, al mediador gaseoso vasoactivo CO y a la liberación de hierro, un regulador génico. Se han adjudicado a cada uno de estos productos efectos propios sobre la fisiología celular.

El hemo es un complejo de Fe^{2+} con protoporfirina IX, que se transforma en hemina cuando el hierro se oxida. El grupo hemo es una molécula esencial para la vida de los organismos aerobios, al servir como grupo prostético de numerosas hemoproteínas con funciones biológicas diversas [56]. Asociado a proteínas, el grupo

hemo participa en reacciones de óxido reducción, oxigenación, hidroxilación, transporte y almacenamiento de oxígeno, monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO). En contraposición, cuando el grupo hemo se encuentra libre en altas concentraciones es un pro-oxidante lipofílico que promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas; también desestabiliza el citoesqueleto y las proteínas asociadas a la membrana, con lo que compromete tanto su estructura como el transporte celular [57, 58]. En este sentido, la degradación del hemo libre contribuye al mantenimiento del estado redox celular [59].

La biliverdina y la bilirrubina, producto de la actividad de la enzima biliverdina reductasa, son moléculas con capacidad de captar especies reactivas del oxígeno como anión superóxido, radical peroxilo y peroxinitrito [60, 61].

Por último, el monóxido de carbono es una molécula gaseosa cuya vida media es de aproximadamente 4 horas y que circula libremente por el microambiente donde es producido. Es conocido por ser tóxico para el desarrollo de la vida a concentraciones elevadas ya que, 1) tiene unas 250 veces más afinidad por el grupo hemo de la hemoglobina que el oxígeno formando una nueva especie, la carboxihemoglobina y disminuyendo la concentración de oxihemoglobina, y con ello, la difusión de oxígeno a los tejidos; 2) inhibe la actividad de otras proteínas que contienen el grupo hemo, como los citocromos, entre ellos, la citocromo oxidasa, bloqueando la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, por lo que reduce la capacidad de la célula para producir energía; 3) al bloquear la cadena respiratoria, genera moléculas con alto poder oxidante como anión superóxido y peróxido de hidrógeno, que dañan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. A menores concentraciones se lo ha relacionado con diversas funciones biológicas de la HO-1, como citoprotección, vasodilatación, y efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos, o anti-proliferativos [62].

1.9- Mecanismos de inducción de HO-1

Si bien se ha estudiado extensamente la regulación de la actividad de HO-1 en diversos sistemas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, su participación en la regulación de la fisiología de las glándulas esteroideogénicas aún no se ha caracterizado completamente. Ambas isoformas de HO (HO-1 y HO-2) han sido detectadas en testículo de rata sugiriéndose que la expresión de HO-1 en las células de Leydig regula la apoptosis de las células germinales premeióticas, modula la

espermatogénesis en condiciones de estrés y tiene una función protectora en las células espermatogénicas [63]. Más recientemente se ha demostrado que la inducción de HO-1 también modula la esteroidogénesis en células de Leydig [64]. Asimismo se ha detectado actividad de HO en placenta y ovario, vinculándose a la misma con efectos vasculares y de citoprotección [65].

En 1992 Maines y Trakshel describieron una actividad enzimática de HO en la glándula adrenal [66]. Posteriormente, en nuestro laboratorio se identificaron las isoformas HO-1 y HO-2 en la corteza adrenal de rata y en una línea celular derivada de un tumor adrenal murino (Y1). También demostramos la inducción de HO-1 por ACTH en células de ZF adrenal de rata, efecto que involucra la actividad de PKA y un incremento en la transcripción génica sin afectar la estabilidad del ARNm correspondiente [1]. En forma semejante a lo observado para el NO, nuestros resultados sugirieron que el CO regula la esteroidogénesis en las células adrenales [67]. También demostramos que el tratamiento con LPS induce la expresión de HO-1 en la corteza adrenal de rata, un efecto posiblemente mediado por el NO producido por la isoforma inducible de NOS [2] y que la incubación con concentraciones suprafisiológicas de glucosa induce la expresión de HO-1 en células adrenales [67].

El análisis del promotor del gen *hmx-1* de ratón, permitió identificar un motivo de 10 pb (T/CGCTGAGTCA) denominado elemento de respuesta al estrés (StRE). Este motivo está presente en múltiples copias en dos regiones *enhancer* (E1 y E2, localizadas a -4 y -10 kb del sitio de iniciación de la transcripción) y se ha postulado que media la activación del promotor en respuesta muchos de los inductores de HO-1 analizados hasta el momento [68]. Otras secuencias consenso para la unión de factores de transcripción que se solapan con los StRE (AP-1 y otros) son el sitio de unión de factores de transcripción diméricos constituidos por miembros de la familia de Jun, Fos, ATF, CREB, Maf y otros que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción con dominios de cierre de leucina. Un papel particularmente importante en la regulación del gen *hmx-1* se atribuye actualmente a los CNC-bZip. Estos factores incluyen a p45, a los factores eritroides nucleares Nrf1, Nrf2, Nrf3 y a Bach1/2 que se heterodimeriza principalmente con las pequeñas proteínas Maf (MafF, MafG y MafK). El factor Nrf2 (Figura 11), que contiene un dominio de activación transcripcional muy potente, participa en la inducción de genes antioxidantes y detoxificantes de fase II como *hmx-1* en respuesta a múltiples agentes, incluyendo hemo, metales pesados, arsenito, curcumina, 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 y varios reactivos electrofílicos [69]. En

estado basal, Nrf2 está anclado al citoplasma por su interacción con la proteína Keap1 y es degradado por el proteosoma por un mecanismo que involucra su ubiquitinación mediada por Cul3. Keap1 posee dominios sensibles a agentes electrofílicos que provocan la liberación de Nrf2 y su acumulación y desplazamiento al núcleo. A su vez, la fosforilación de Nrf2 también produce su activación [69].

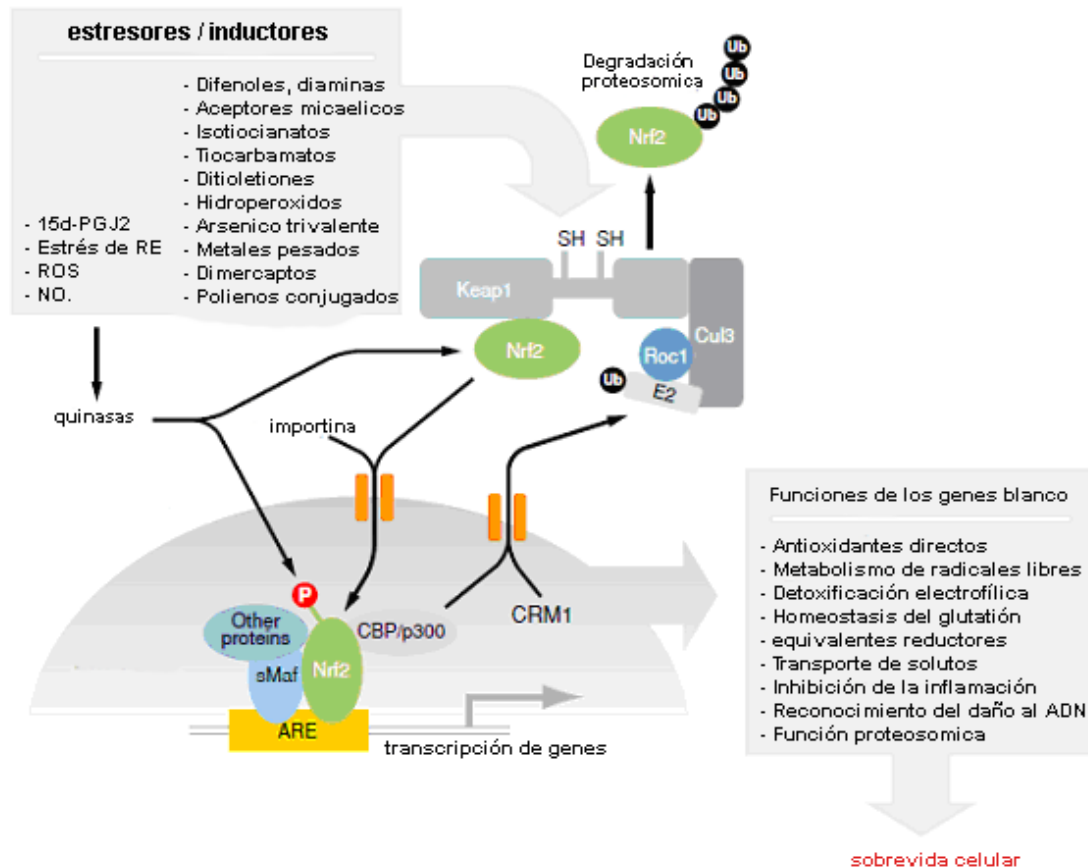


Figura 11: Esquema general de inducción de genes por la vía de señalización Keap1-Nrf2-ARE. Pequeñas moléculas de origen endógeno o exógeno producen la activación de genes regulados por Nrf2. Estos agentes interrumpen la asociación entre Keap1 y Nrf2, llevando a la fosforilación de Nrf2 y a su estabilización y desplazamiento al núcleo. Este mecanismo lleva a la inducción de genes antioxidantes y que participan en el catabolismo de xenobioticos, que confieren a la célula una respuesta adaptativa de resistencia frente al estrés ambiental mediado por radicales libres y agentes electrofílicos [44].

Las proteínas Bach no poseen dominios de activación transcripcional y por lo tanto se postula que los heterodímeros Bach/Maf funcionarían como represores, bloqueando la unión de factores activadores como Nrf2 a sus sitios en los promotores. Se ha demostrado que el factor Bach1 reprime la inducción del gen de HO-1 mediante su unión a los sitios *enhancer*. La unión de hemo a Bach1 provoca su exportación del

núcleo dejando los *enhancers* libres para su ocupación por factores activadores (ej, Nrf2) [70].

Si bien el hemo puede funcionar como ligando e interactuar directamente con el ADN para activar al gen de HO-1, este no es el mecanismo utilizado por la mayoría de los inductores. Las evidencias indican que, en general, los inductores incrementan la expresión de HO-1 activando una o más cascadas de señalización que eventualmente convergen en activadores de la transcripción. Los segundos mensajeros AMPc y GMPc, que activan a la PKA y a la PKG respectivamente, participan en algunas de esas cascadas de señalización, interviniendo en la transducción de las señales de diversas hormonas y estímulos extracelulares. Podemos citar como ejemplo los experimentos de Immenschuh *et al* que demostraron que la inducción de HO-1 por AMPc, en cultivos primarios de hepatocitos de rata, es mediada por el elemento de respuesta a AMPc/proteína activadora-1 en el promotor proximal y requiere la activación de la vía de señalización de PKA [71]. Esta vía también participa de la inducción de HO-1 en células de músculo liso vascular y en células endoteliales estimuladas con fosfolípidos oxidados [72, 73]. Dado que el NO activa la producción de GMPc se sugirió que éste podría ser un activador del gen *hmox-1*, lo que fue demostrado en hepatocitos y en células endoteliales [71, 74].

Las vías de las MAPKs participan de las respuestas celulares al estrés regulando la expresión génica, la proliferación celular y la apoptosis. Con relación a la inducción de HO-1, la bibliografía indica que la utilización de las diferentes cascadas de señalización de MAPKs y sus factores de transcripción blanco depende del inductor, del tipo celular y de la especie. Por ejemplo, se ha demostrado la participación de la vía de p38 MAPK en la activación por hipoxia de HO-1 [75] y la de ERK y p38 MAPK en la activación por arsenito de sodio, metales pesados y NO [76, 77].

También se ha demostrado la participación de la vía de NFκB, un factor proinflamatorio y sensible al estado redox, en la inducción de HO-1 por compuestos polifenólicos como el resveratrol [78].

Finalmente, un estímulo puede provocar la activación de más de una vía de inducción de HO-1. En este sentido, Chen *et al* demostraron que la inducción de HO-1 por estatinas depende de la acción conjunta de las vías GMPc/PKG y MAPKs ERK y p38 en macrófagos murinos [79].

El estrés oxidativo es considerado uno de los principales inductores de HO-1 y entre los mecanismos de transducción de señales demostrados en diversos sistemas celulares pueden mencionarse los que involucran la activación de las vías de MAPKs, PI3K/Akt, PKC y los factores de transcripción NFκB, AP-1, Nrf2, p53, HIF1, entre otros [80-82].

OBJETIVOS

En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado la inducción de la expresión de HO-1 por ACTH [1] y por LPS [2] en células adrenocorticales y se ha sugerido que el aumento en la actividad de HO-1 protege a las células de las injurias oxidativas [68, 83, 84]. Sin embargo, el estudio de los mecanismos moleculares y de los factores de transcripción involucrados en estos efectos no había sido encarado hasta el momento.

En ese contexto nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Analizar la participación de la actividad de HO-1 en la modulación de la esteroidogénesis adrenal.
2. Caracterizar los efectos de ACTH, LPS y NO en la expresión de HO-1 en células adrenales.
3. Identificar los elementos responsables de la respuesta a ACTH, LPS y NO en la región promotora del gen *hmx1* murino.
4. Estudiar los factores de transcripción involucrados en la inducción del gen por ACTH, LPS y NO.
5. Determinar los mecanismos de transducción de señales involucrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

2- MATERIALES Y METODOS

2.1- Reactivos

La hormona adrenocorticotropina (ACTH) en forma liofilizada fue provista por Laboratorios Elea (Buenos Aires, Argentina), 8Br-cAMP, 8-Br-cGMP, 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), dietilentriamina/nonoato (DETA/NO), etilén glicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), SB203580, SP600125, PD98059 (inhibidores de MAPKs), wortmanina (inhibidor de PI3K), H89 (inhibidor de PKA), apocinina (inhibidor de NADPH oxidasa), PS1145 (inhibidor de IKK:IkB:NfκB), lipopolisacárido bacteriano de *E. coli*, Albúmina sérica bovina (BSA), Ro32-0432, Ro31-8220, queleritrina, staurosporina (inhibidores de PKC), Tritón X-100, aprotinina, leupeptina, PMSF, pepstatina A, Tween-20, HEPES, EDTA fueron provistos por SIGMA Aldrich (Buenos Aires, Argentina). La DNAsa I, RNAsin[®] y el plásmido pGL2 fueron adquiridos a Promega – Biodynamics SRL. El BAPTA-AM fue gentilmente cedido por la Lic. Maria Gracia Gervasi del Laboratorio de la Dra. Silvina Perez Martinez. El suero fetal bovino, el suero de caballo, la penicilina, la estreptomycinina, el medio HAM F10, el medio F12/DMEM, Taq polimerasa, Lipofectamina 2000 y el TRIZol[®] fueron comprados a Invitrogen, Life Technologies (BA, Argentina). La membrana de PVDF fue adquirida de TecnoLab S.A. (Biorad). Los demás reactivos fueron productos comerciales de la mejor calidad disponible.

2.2- Líneas celulares

La línea celular adrenocortical murina Y1 fue adquirida a la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue desarrollada por Yasumura et al [9] a partir de un tumor adrenocortical de ratón, y clonada luego de que el tumor fuera adaptado a las condiciones de cultivo. Las células en cultivo crecen en monocapa y poseen una morfología similar a la de las células epiteliales, alcanzando una densidad aproximada de saturación de 2.7×10^5 células/cm². Una descripción de los métodos de cultivos de estas células ya ha sido publicada [10]. Brevemente, las células fueron cultivadas en medio de crecimiento HAM F10 suplementado con suero de caballo (12,5%), suero fetal bovino (2,5%) ó DMEM/HAM F12 1:1 v/v suplementado con suero fetal bovino al

5 %, penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml) en estufa a 37°C, con gaseo constante (5% CO₂).

2.3- Extracción de ARN total

Se aisló ARN total de cultivos de células Y1 utilizando la técnica de isotiocianato de guanidinio (TRIzol[®]). En todos los casos se utilizó material libre de ARNasas. Luego de los distintos tratamientos se conservó el medio de cultivo, y se lisaron las células con el reactivo TRIzol[®] (1 ml de reactivo cada 10 cm²). Posteriormente se agregó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de reactivo utilizado y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 x g a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio al cual se le agregaron 0.5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de reactivo inicial y se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. La fase orgánica se guardó para la obtención de proteínas. El *pellet* resultante se lavó 3 veces con etanol 75% frío. En el paso final el ARN obtenido se resuspendió en agua libre de ARNasas. La cantidad y pureza del ARN obtenido se verificó por medición de la absorbancia de la luz U.V. a 260 nm y 280 nm. Por último las muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta ser utilizadas para los ensayos de RT-PCR.

2.4- RT-PCR

Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa I (grado de amplificación) para eliminar cualquier posible contaminación con ADN. Para la síntesis del ADN copia (ADNc) se utilizaron 2 µg de ARN total obtenido a partir de los cultivos de células Y1. La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó utilizando 200 UI de la transcriptasa reversa del MMLV (Moloney murine leukemia virus), hexámeros de secuencia variable (random primers) 14 ng/µl, dNTP 0.5 mM cada uno y 25 UI de RNAsin[®] inhibidor de ribonucleasas en un volumen total de 20 µl. En algunos tubos se omitió el agregado de transcriptasa reversa como control de pureza de la preparación de ARN. La reacción se llevo a cabo a 37°C durante 50 minutos y posteriormente la enzima se inactivó por calentamiento durante 15 minutos a 70°C.

2.5- PCR

Se procedió a la amplificación por PCR con *primers* específicos diseñados a partir de secuencias publicadas en el Gene Bank. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: hHO-1: forward: 5'-GAGTGTAAGGACCCATCGGA-3' reverse: 5'-GCCAGCAACAAAGTGCAAG-3'. Para la normalización de los resultados se usó el ARN ribosomal 18S; forward 5'-ACGGAAGGGCACCACCAGGA-3' y reverse 5'-CACCACCACCCACG GAATCG-3'. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Tpersonal (Biometra, Alemania) a partir de 5 µl de ADNc (2 µg aproximadamente). El ADN se agregó a 15 µl de la siguiente mezcla de reacción: MgCl₂ 1.5 mM; dNTPs 0.2 mM de cada uno, primers específicos en una mezcla forward/reverse 0.5 µM de cada uno, Taq polimerasa 0.625 UI y buffer de PCR 1X. La amplificación se realizó según el siguiente protocolo general: 1) desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C, 2) n ciclos (se determinó el número de ciclos adecuado para asegurar la fase lineal de la amplificación i) desnaturalización por 30 segundos a 94°C, ii) temperatura de hibridación de 30 segundos a 55°C y iii) extensión de 1 min a 72°C, 3) extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio en buffer TAE 1X (Tris 2M pH 8; EDTA 0,5 M). Luego de la separación electroforética, las bandas obtenidas se cuantificaron por iluminación con luz U.V. y densitometría utilizando el programa FluorChem, AlphaEaseFC software.

2.6- PCR en tiempo real

ADNc total proveniente de la retro-transcripción fue utilizado como molde. Como fluoróforo se usó el reactivo Eva Green[®] (BIOTIUM, GenBiotech SRL), y el ciclado se llevó a cabo en el equipo ROTOR-GENE 6000 (Qiagen[®]). Para la amplificación de genes específicos se usaron las combinaciones de primers listados en la Tabla 1 que se muestra a continuación. Los datos obtenidos mediante la PCR tiempo real fueron analizados usando el método 2-DDCT, descrito previamente [85].

Primer	Secuencia
Gclc Forward	5'-AGTGGCCCAGAAGCGAGATGC-3'
Gclc Reverse	5'-ACCACAGCGTTGCCGCCTTT-3'
Gclm Forward	5'-GCATCCCCGAGGTGCGAGTG-3'
Gclm Reverse	5'-AGTGGTTCCTGTGAGCGCGC-3'
NQO1 Forward	5'-CATGGCGGCGAGAAGAGCCC-3'
NQO1 Reverse	5'-CAGCAGCCTCCTTCATGGCGT-3'
HO-1 Forward	5'-CAACAGTGGCAGTGGGAATTT-3'
HO-1 Reverse	5'-CCAGGCAAGATTCTCCCTTAC-3'
18S Forward	5'-ACGGAAGGGCACCACCAGGA-3'
18S Reverse	5'-CACCACCACCCACGGAATCG-3'

Tabla 1: Listado de primers utilizados para las reacciones de PCR en Tiempo Real.

2.7- Obtención de proteínas totales

Las proteínas totales de los cultivos de células Y1 se obtuvieron luego de la purificación del ARN total a partir de la fase orgánica. Se precipitaron las proteínas agregando 1.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol[®] y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet resultante se lavó 3 veces con hidrocloreuro de guanidina 0.3 M en etanol 95 % y se resuspendió en SDS 1%.

En otros experimentos se lisaron las células en cultivo utilizando 0.4 ml de buffer de lisis por pocillo (Tris HCl pH 7.4 20 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; Tritón X-100 1%; leupeptina 10 µM; aprotinina 0.8 µM).

2.8- Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras provenientes de los cultivos de células Y1 se determinó según el método de Lowry [86], utilizando BSA como estándar con las siguientes modificaciones: se mezclaron alícuotas del lisado celular de 10 µl con 1 ml de una solución conteniendo: deoxicolato de sodio (DOC) 0.04%, ácido tricloroacético (TCA) 8% y luego de la centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos se

resuspendieron los precipitados correspondientes en el reactivo de Lowry procediendo a las determinaciones por el método clásico.

2.9- Inmunoblot

Las muestras de proteínas de las células Y1 fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Para ello, se tomaron alícuotas correspondientes a 50 µg de proteína y se agregó ¼ del volumen de muestra de TCA 100% manteniéndose a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 15000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con acetona fría. Se dejaron secar las muestras y se resuspendieron en 20 µl de SB 1X (Tris-HCl pH 6.5 50 mM, Glicerol 10%, SDS 2% y Azul de bromofenol) calentando 15 minutos a 65 °C. Se agregó DTT 0.1 M y se continuo calentando durante 5 minutos a 95°C. Para la separación electroforética se utilizaron geles de poliacrilamida 10%. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF en un aparato Trans Blot SD (Biorad, Hercules, CA, USA) en buffer de transferencia (Tris HCl 25 mM pH 8.3; Glicina 192 mM y metanol 20%) a 15V, 280 mAmp durante 60 minutos. Las membranas fueron tratadas con solución de bloqueo (leche en polvo descremada 5% en TBS-Tween[®] 0.1%) durante una hora y luego fueron incubadas toda la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales obtenidos de conejos contra HO-1, Nrf2, Akt/PKB fosforilado, Akt/PKB total y actina. Se utilizó como segundo anticuerpo un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante y el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham Life Sciences). Para corroborar la electrotransferencia y como control de carga se tiñeron las membranas de PVDF con Ponceau 0.2% en TCA 3%.

2.10- Determinación de niveles de lipoperóxidos

Se midieron los niveles de lipoperóxidos celulares mediante la determinación de la base de Schiff formada entre los lipoperóxidos y el ácido tiobarbitúrico (TBA). En algunos pocillos de células se agregó H₂O₂ 80 µM y SO₄Fe 50 µM con el objeto de analizar el comportamiento del sistema citoprotector frente al estrés oxidativo exogeno y se incubó durante una hora en estufa de cultivo. Finalizados los tratamientos, las células se lavaron tres veces con 0.5 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X y se

homogeneizaron en 1 ml de buffer PBS 1x conteniendo SDS 0.75%. Luego se agregó a cada tubo 0.5 ml de una solución de TBA 10 mg/ml en buffer acetato de sodio pH 2.3. Las muestras se incubaron 1 hora a 100°C y se determinó la fluorescencia emitida a 555nm (excitación 515 nm). Los valores se expresaron como concentración de MDA en μM por mg de proteína, usando como estándar el MDA preparado a partir del 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

2.11- Glutation reducido (determinación de los grupos tioles totales no proteicos)

Los compuestos con grupos $-\text{SH}$ reaccionan con el DTNB (ditionitrobenceno) para formar TNB (tionitrobenceno) que absorbe a 412 nm. Brevemente, se homogenizó el cultivo celular de cada pocillo en 300 μl de buffer fosfato 50 mM pH 7.4. Luego se agregó 75 μl de TCA 50% y EDTA 1mM manteniendose por 5 minutos en frío y se centrifugo durante 5 minutos a máxima velocidad. Al sobrenadante de la centrifugación se le agregó DTNB (0.25mg/ml en buffer fosfato 0.5M) determinándose su absorbancia a 412 nm. Para la curva de calibración se utilizó un estándar de glutation reducido.

2.12- Determinación de especies reactivas de oxígeno

Luego de los distintos tratamientos, las células se lavaron tres veces con PBS 1X (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) y se suspendieron con 500 μl de medio sin suero (100 μl se guardaron para determinar proteínas totales). Al volumen restante se le agregó 10 μl de una solución de diacetato de 2', 7-dihidro dicloro fluoresceína (DCF/DA) 100X en DMSO para llegar a una concentración final de 10 μM . Se incubó durante 30 minutos a 37 °C, luego se centrifugó y se resuspendió el pellet celular en PBS 1X (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) incubándose durante 45 minutos en las mismas condiciones. Se determinó la fluorescencia emitida a 525 nm (480 nm de excitación).

2.13- Actividad de catalasa

La actividad de catalasa se evaluó *in vitro* mediante la determinación del consumo de peróxido de hidrógeno, según procedimientos descritos sobre los que se realizaron modificaciones menores [87]. Brevemente, las células se homogenizaron en

buffer $\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}/\text{KPO}_4\text{H}_2$ 15 mM KCl 60 mM pH 7.4 con Tritón X-100 20% en frío. Se calibró el espectrofotómetro con una mezcla de 50 μl del homogenato y 900 μl de buffer fosfato 50 mM pH 7.4. Se agregaron 50 μl de H_2O_2 (90 μl de H_2O_2 100 volúmenes en 5 ml de buffer), se mezcló por inversión y se determinó la absorbancia cada 10 segundos durante cuatro minutos. Finalmente a partir de la absortividad molar a 240 nm del H_2O_2 ($0.0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se calculó la actividad de la enzima, expresándosela como μM de H_2O_2 consumidos por minuto por μg de proteína de tejido ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína).

2.14- Transfección de células Y1

Se realizaron transfecciones transitorias utilizando el reactivo Lipofectamina 2000. Con este fin, se sembraron aproximadamente 20000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio con suero y antibióticos HAMF10 o DMEM/HAMF12. Se utilizaron 0.2 μg de ADN plasmídico total. Las soluciones de plásmido y 2 μl de lipofectamina se diluyeron separadamente en 50 μl de medio optiMEM y luego de 5 min de incubación se mezclaron y se prosiguió con la incubación durante 20 min a temperatura ambiente. El complejo ADN-lipofectamina se agregó entonces a las células que se mantuvieron a 37°C en atmósfera humedecida de 95% aire y 5% CO_2 . Luego de 3 horas, se repuso el medio con suero y antibiótico y las células se incubaron durante 24 horas antes de iniciar los ensayos. En todos los casos las células se cotransfectaron con un plásmido de expresión pCMV- β -galactosidasa para la normalización de la actividad de luciferasa.

2.15- Construcciones plasmídicas

El plásmido conteniendo el fragmento de -4045;+74 del promotor murino de HO-1 (p[-4]HO-1) fue gentilmente cedido por Dr. MA. Perrella (Pulmonary and Critical Care Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, USA.); los reporteros $\kappa\text{B}/\text{LUC}$, CRE/LUC y los plásmidos de expresión p65, pCREB y pCREB-DN-M1 fueron gentilmente cedidos por Dra. A. Pecci (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.); el plásmido de expresión hHO-1 fue cortesía de la Dra Elba Vazquez (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y

Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.); los plásmidos pNrf2/LUC, pNrf2-FL, pNrf2gal4 y pG5/LUC fueron cedidos amablemente por Dr. O. Coso (Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IFYBINE-Conicet, Buenos Aires, Argentina.).

Utilizando como molde el plásmido p(-4)HO-1, se generaron los siguientes fragmentos del promotor utilizando la técnica de PCR *long range*: -4045,+74; -3216,+74; -2700,+74; -2050,+74; -1200,+74; -353,+74; -145,+74; -16,+74 y +14,+74. Para su obtención se diseñaron primers específicos para cada zona del promotor anexándoles en el sitio 5' la secuencia consenso para las enzimas de restricción NheI para primers forward y XhoI para primers reverse. El ADN molde se agregó a 15 µl de la siguiente mezcla de reacción: MgCl₂ 1.5 mM; dNTPs 0.2 mM de cada uno, primers específicos en una mezcla forward/reverse 0.5 µM de cada uno, Pfu Taq polimerasa con actividad *proofreading* (Invitrogen, Life Technologies, Argentina) 0.625 UI y buffer de PCR 1X. La amplificación se realizó según el siguiente protocolo general: 1) desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C, 2) 25 ciclos i) desnaturalización por 30 segundos a 94°C, ii) a la temperatura de hibridación de 30 segundos (variable para cada set de primers) y iii) extensión de 0,5 a 5 min a 72°C de acuerdo al tamaño del fragmento, 3) extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio en buffer TAE 1X (Tris 2M pH 8; EDTA 0,5 M). Luego de la separación electroforética, las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron purificadas usando Accuprep PCR Purification Kit (GenBiotech SRL). Los fragmentos purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y NheI y subclonados río arriba del gen de luciferasa de luciérnaga en el plásmido básico pGL2. Luego fueron amplificados utilizando bacterias competentes crecidas en medio LB conteniendo el antibiótico ampicilina 1µg/ml y purificados usando AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER, GenBiotech SRL) o el protocolo de miniprep o maxiprep de Maniatis [88].

2.16- Determinación de la actividad enzimática de los plásmidos reporteros

La actividad de luciferasa de luciérnaga y de β-galactosidasa se determinaron con kits adecuados (Steady-Glo® Firefly Luciferase Assay System, Promega, USA; β-Galactosidase Assay Kit, GE Healthcare, Argentina) usando un lector de microplaca

multidetector (OMEGA, BMG-LabTech) y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

2.17- Transfección de siRNAs

Se diseñó un siRNA con el objetivo de inhibir la expresión del gen de HO-1 (No. de acceso NM_010442.2). Se sintetizaron las secuencias 5'-CTGACAGAGG AACACAAAGA-3' (nucleótidos 793-812 de ADNc de HO-1), y 5'-AAGGTAATGCTGCGCTAAAT-3' (siRNA *random*) según el protocolo publicado [89]. Un día antes de la transfección, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una concentración de 2.5×10^5 células/pocillo para lograr una confluencia de aproximadamente 80% al día siguiente. Las transfecciones fueron llevadas a cabo usando 400 ng/ml de siRNA en medio Opti-MEM y 2 μ l de reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de las transfecciones las células se mantuvieron en medio de crecimiento hasta comenzar los tratamientos.

2.18- Viabilidad celular

La viabilidad celular fue analizada usando la técnica de exclusión por tinción con azul tripán. Luego del tratamiento con distintas drogas las células se tiñeron en una dilución al 1/2 con azul tripán y se montaron en una cámara de Neubauer. Aquéllas células teñidas de azul oscuro fueron consideradas como “no viables”, el resto (brillantes y sin color) como “viables”. Ninguno de los tratamientos provocó cambios en la viabilidad celular.

2.19- Producción de esteroides

Se determinó la concentración de progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoensayo, según lo descrito previamente [39, 67].

2.20- Estadística

Los resultados se presentan como media \pm SEM. Se evaluó la distribución normal de los resultados mediante el método de Kolmogorov-Smirnov (parámetro KS). Se realizaron los análisis estadísticos utilizando el test t de Student o ANOVA según corresponda seguidos de los tests de Tukey, Bonferroni o Dunnett. Todos los cálculos fueron realizados usando GraphPad InStat version 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

3- Participación de HO-1 en la regulación de la esteroidogénesis adrenal

Se analizó el rol de la actividad enzimática de HO-1 en la modulación de la producción de esteroides en células adrenales Y1. Se utilizó un enfoque molecular que permitió determinar los efectos del bloqueo de la expresión o de la sobreexpresión de la enzima sobre la esteroidogénesis adrenal. En el primer caso, las células fueron transfectadas con siRNAs específicos para HO-1 o con una secuencia oligonucleotídica *random* (inespecífica) como control. Se verificó la eficiencia de la inhibición de la expresión de HO-1 por western blot y se evaluó la producción de esteroides por RIA. Los resultados obtenidos mostraron que el bloqueo de la expresión de HO-1 produjo un aumento significativo de la esteroidogénesis tanto en condiciones basales como luego del tratamiento con ACTH 12.5 mUI/ml durante 5 horas (Figura 12A).

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de HO-1, las células fueron transfectadas con el plásmido hHO-1, que contiene el ADNc de HO-1 humana bajo el control de un promotor constitutivo fuerte o con un plásmido conteniendo el ADNc de β -galactosidasa. La sobreexpresión de HO-1 se verificó por RT-PCR. En la Figura 12B se observa que la sobreexpresión de hHO-1 disminuyó tanto la esteroidogénesis basal como la estimulada con ACTH 12.5 mU/ml durante 5 horas.

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis del rol modulador local de esta actividad enzimática sobre la esteroidogénesis adrenal.

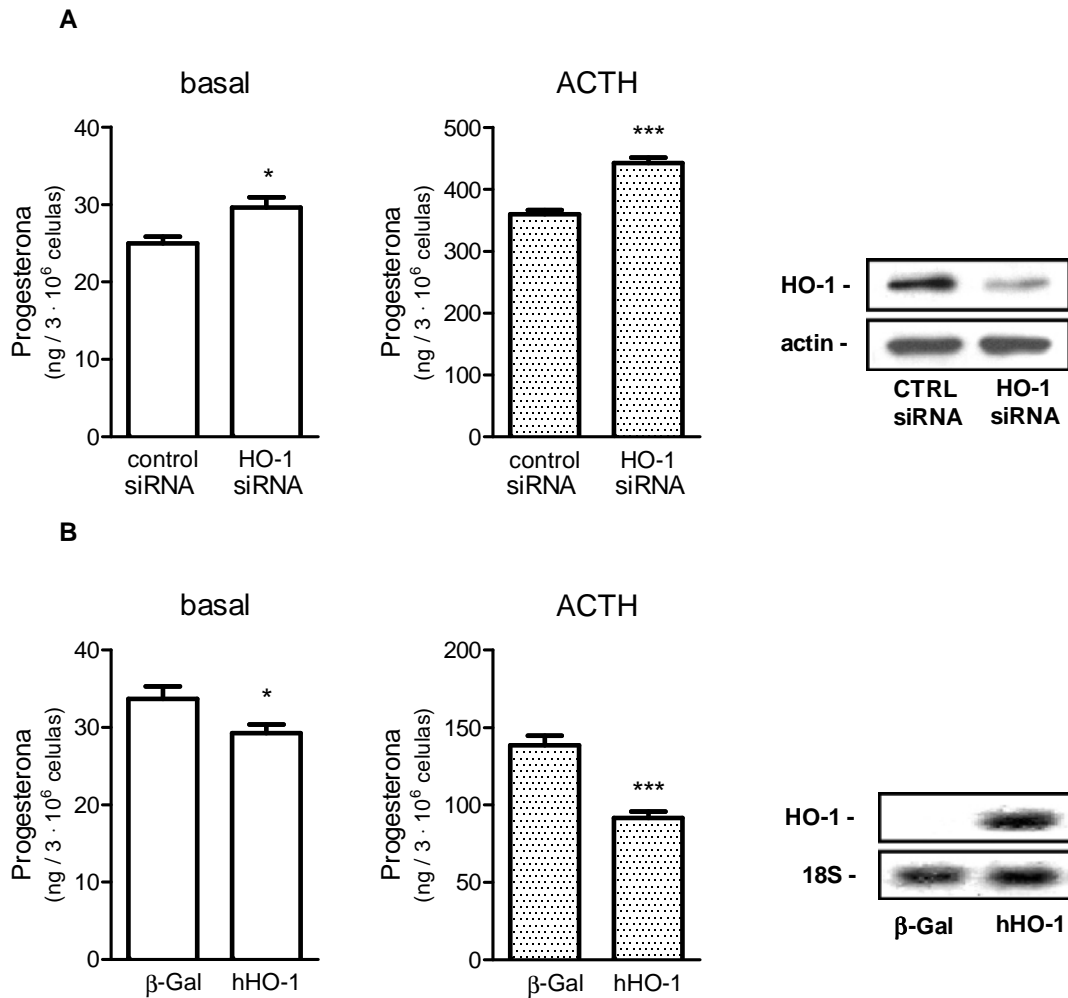


Figura 12: Efecto de HO-1 en la esteroidogénesis adrenal. A) células Y1 fueron transfectadas con un siRNA específico para HO-1 o con una secuencia control *random* y se incubaron durante 48 horas. Se cambió el medio y se continuó la incubación durante 5 horas en ausencia (panel izquierdo) o presencia de ACTH 12.5 mU/ml (panel central). Se determinó la concentración de esteroides en el medio de cultivo y los niveles de HO-1 por western blot (derecha). B) Las células fueron transfectadas con los plásmidos hHO-1 o β-Gal y se incubaron durante 48 horas. Se cambió el medio y se continuó la incubación durante 5 horas en ausencia (panel izquierdo) o presencia de ACTH 12.5 mU/ml (panel central). Se determinó la concentración de esteroides en el medio de cultivo. A la derecha se muestra el control de sobreexpresión de HO-1 realizado por RT-PCR. Los datos se presentan como media ± SEM, N=4, *p<0.05, ***p<0.01 vs. Control ó β-Gal según corresponda por el test t.

4- Efecto del ACTH sobre la expresión de HO-1

4.1- Actividad del promotor de HO-1

Con el objeto de estudiar el efecto del ACTH sobre la actividad del promotor de HO-1 se generaron fragmentos del promotor murino de HO-1 por la técnica de PCR *long range*, como se describió en Materiales y Métodos, y se clonaron río arriba del gen de luciferasa en el esqueleto plasmídico pGL2. Los fragmentos clonados fueron: -4045;+74, -3216; +74, 2700; +74, -2050;+74, -1200;+74 y -353;+74, -145;+74, -16;+74 y +14;+74. Para evaluar la actividad de los fragmentos del promotor se transfectaron células Y1 con los plásmidos recombinantes indicados y se evaluaron las actividades enzimáticas luego de la incubación con ACTH 12.5 mU/ml durante 24 horas. De acuerdo a los resultados indicados en la Figura 13 se concluye que el tratamiento con ACTH produce un aumento significativo en la actividad de todos los plásmidos analizados, lo que sugiere que al menos un elemento de respuesta a ACTH se encuentra localizado en el fragmento mas pequeño estudiado, comprendido entre -353 y +74 pb del promotor. Los plásmidos conteniendo los fragmentos -145;+74, -16;+74 y +14; +74 y pGL2 vacío no presentaron actividad detectable (datos no mostrados).

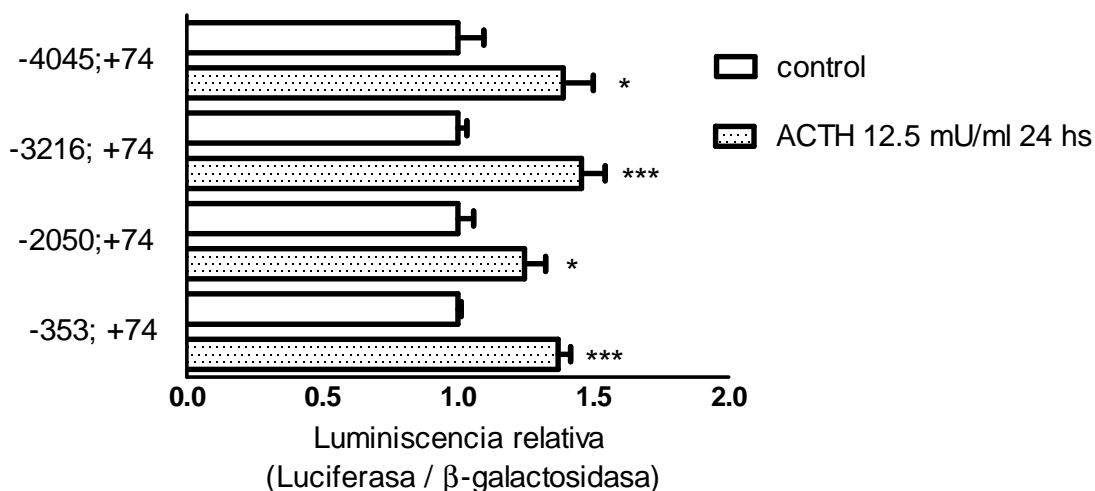


Figura 13: Actividad del promotor de HO-1. Las células Y1 fueron transfectadas con plásmidos pGL2 conteniendo diferentes fragmentos del promotor del gen de HO-1 murino: -4045;+74, -3216; +74, -2050;+74 y -353; +74 clonados río arriba del gen de luciferasa y un plásmido de expresión de β -galactosidasa. Ambas actividades se evaluaron luego de la incubación de las células con ACTH 12.5 mU/ml durante 24 horas. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=4 * p <0.05 *** p <0.001 vs. el respectivo control, por el test t.

Es sabido que la unión del ACTH a su receptor provoca la activación de la enzima adenilato ciclasa con la consecuente producción de AMPc y la activación de la PKA. En este sentido, nos preguntamos si esta vía de transducción de señales podía estar involucrada en la activación del promotor de HO-1 por ACTH. Para estos experimentos se transfectaron células Y1 con dos de las construcciones antes mencionadas, -4045;+74 y -353; +74 y se evaluó la actividad de luciferasa luego de la estimulación con el análogo permeable del AMPc, 8BrAMPc. En la Figura 14 se observa que el 8Br-AMPc, tiene la capacidad de activar ambos plásmidos. Este resultado sugiere que la activación del promotor de HO-1 por ACTH podría depender del aumento en los niveles de AMPc y que existen elementos de respuesta al ACTH/AMPc en la región -353; +74.

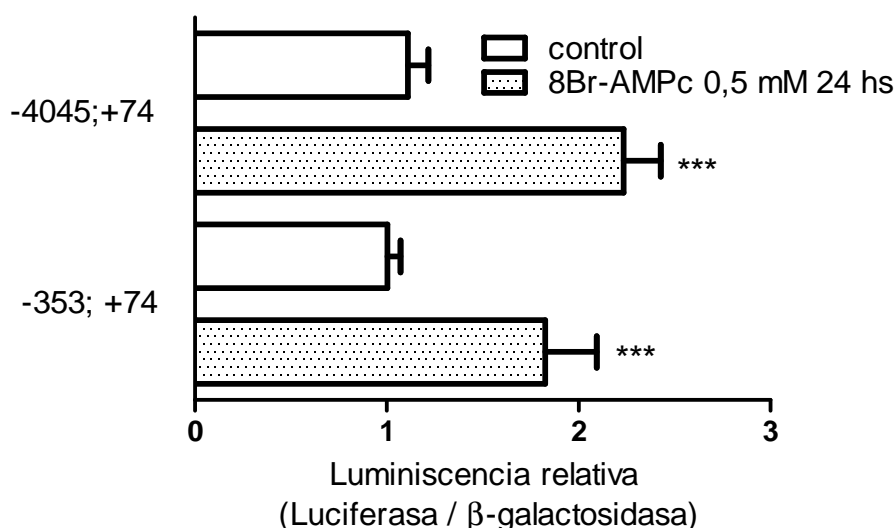


Figura 14: Inducción de la actividad del promotor de HO-1 por AMPc. Las células Y1 fueron transfectadas con plásmidos conteniendo los fragmentos del promotor de HO-1: -4045;+74 y -353; +74 clonados río arriba del gen de luciferasa y con el plásmido de expresión de β-galactosidasa. La actividad de los mismos se evaluó luego de la incubación de las células con 8Br-AMPc 0.5 mM durante 24 horas. Los datos se presentan como media ± SEM, N=4 *** p<0.001 vs. el control respectivo, por el test t.

4.2- Rol del factor de transcripción CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) en la inducción de HO-1

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró la participación de la actividad de PKA en la inducción de HO-1 (aumento en los niveles de ARNm y de proteínas) por ACTH. Por otra parte, es sabido que la PKA tiene la capacidad activar al

factor de transcripción CREB por fosforilación en la serina 133. Estudiamos entonces el efecto de un análogo permeable del AMPc sobre la actividad del plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor de HO-1 murino, inhibiendo la actividad de la quinasa PKA. La Figura 15 muestra que el inhibidor H89 bloquea la inducción de HO-1 por 8Br-cAMP confirmando la participación de PKA en el mecanismo de inducción de HO-1.

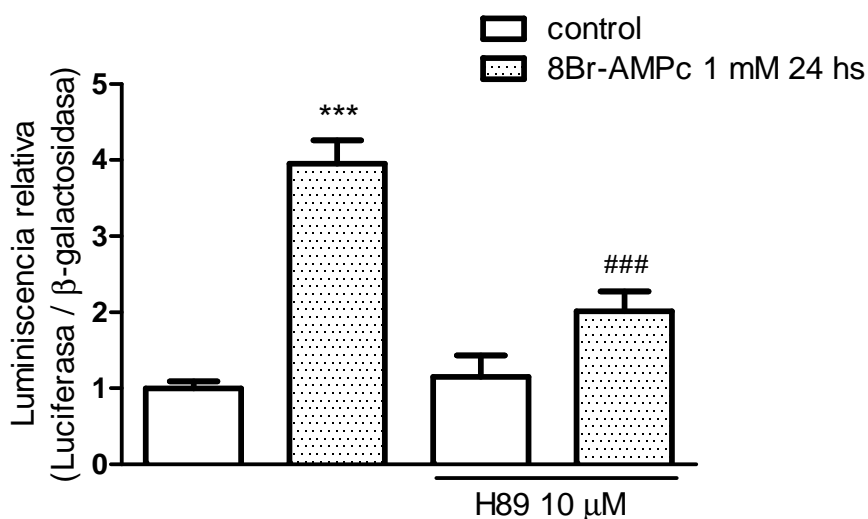


Figura 15: Participación de la PKA en la activación del promotor de HO-1 por AMPc. Se transfectaron células Y1 con el plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor de HO-1 murino y con el plásmido de expresión de β -galactosidasa. Ambas actividades enzimáticas se evaluaron luego de la incubación con 8Br-AMPc 0.5 mM con o sin el agregado de H89 10 μ M durante 24 horas. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=4, *** p<0.001 vs. control, ### p<0.01 vs. 8Br-AMPc 1 mM por el test de Tukey.

Se realizó un análisis “in silico” de los sitios consenso para la unión de factores de transcripción contenidos en el fragmento pequeño del promotor de HO-1 (fragmento -353; +74), utilizando el programa MatInspector (Genomatix) que permitió identificar secuencias consenso para 123 familias de factores. Entre ellas pueden mencionarse las familias que contienen a los factores AP-1, CREB, ETs, E/BOX, CAAT, HIFF y p53. En particular, nuestro interés se centró en aquellos factores relacionados con la vía de transducción del ACTH/AMPc. La Figura 16 muestra la localización de dos sitios consenso para CREB y uno para AP-1 ubicados en una zona aledaña al inicio de la transcripción (-153, -44 y -3 respectivamente).

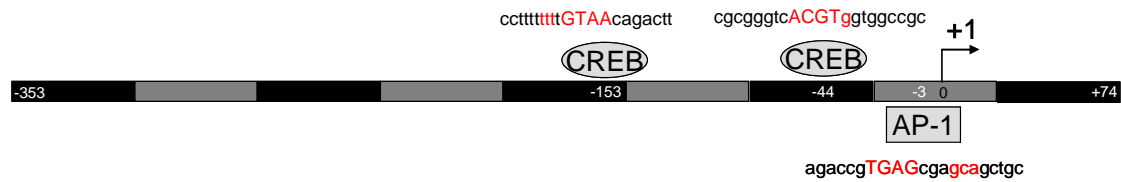


Figura 16: Análisis *in silico* del fragmento 353; +74 del promotor de HO-1: Representación esquemática del promotor de HO-1 realizada utilizando el programa MatInspector Release professional 8.0.5 (Marzo 2011). Se muestran los sitios consenso para los factores CREB (-153 y -44) y AP-1 (-3).

Estudiamos entonces la participación del factor de transcripción CREB en este mecanismo, utilizando un plásmido reportero, CRE/LUC, que contiene múltiples sitios de unión de CREB (sitios CRE) río arriba del promotor mínimo de citomegalovirus (CMV) y del gen de luciferasa. La Figura 17 muestra que el tratamiento con 8Br-AMPC 1 mM durante 24 horas incrementa significativamente la actividad del reportero de CREB en células Y1.

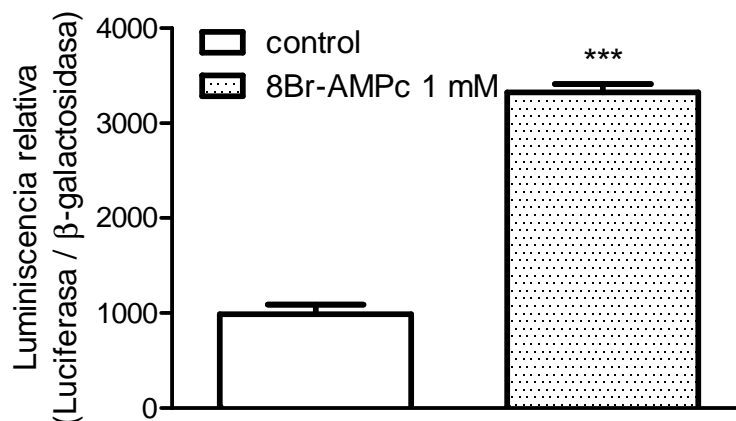


Figura 17: Actividad del reportero CRE/LUC en células Y1 tratadas con AMPc. Las células se transfectaron con el plásmido reportero CRE/LUC y un plásmido de expresión de β-galactosidasa y se trataron durante 24 horas con 8Br-AMPC 1 mM. Los resultados se muestran como media ± SEM, N=4, *** p<0.001 vs. control por el test t.

Como control se determinó el efecto de la sobreexpresión del factor CREB sobre el reportero de CRE en estas células. Con este fin se co-transfectaron células Y1 con el plásmido de expresión de CREB y el reportero de CRE y se analizó la actividad de este último. La Figura 18 muestra que el plásmido reportero CRE/LUC se activa en forma dosis dependiente con los niveles de plásmido de expresión de CREB. Esto indica que el factor de transcripción CREB producido tiene la capacidad de migrar al núcleo y actuar como factor de transcripción activando promotores específicos.

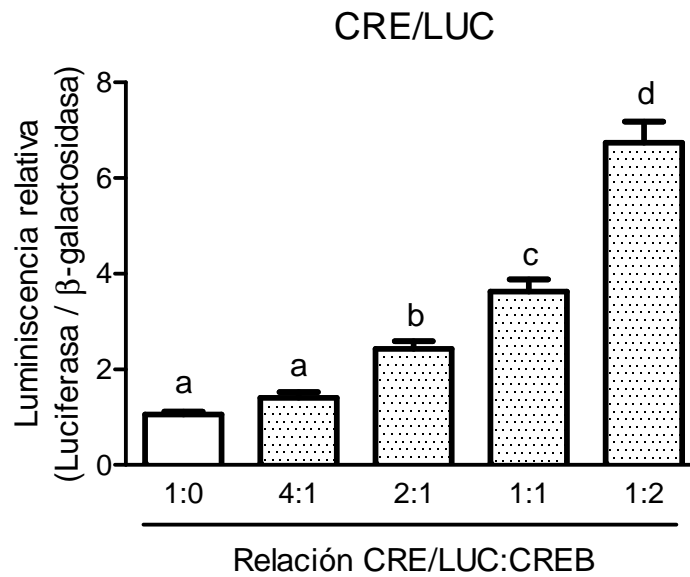


Figura 18: Sobreexpresión de CREB en células Y1. Las células se transfectaron con los siguientes plásmidos: reportero CRE/LUC y de expresión de CREB en las relaciones indicadas, y el plásmido de expresión de β-galactosidasa, y se incubaron durante 24 horas. Se midieron las actividades enzimáticas en homogenatos celulares. Los resultados se indican como media ± SEM, N=4, tienen letras diferentes las columnas significativamente diferentes con un $p < 0.01$ por el test de Tuckey.

Una vez determinada la funcionalidad de CREB en estas células, se estudió el efecto de la sobreexpresión de CREB sobre el promotor de HO-1. Para esto se co-transfectaron células Y1 con los plásmidos conteniendo los fragmentos del promotor -4045;+74 ó -353;+74 y el plásmido de expresión de CREB. En la Figura 19 se puede observar que la sobreexpresión de CREB activa ambos plásmidos de HO-1. También se observa la activación por 8Br-AMPC.

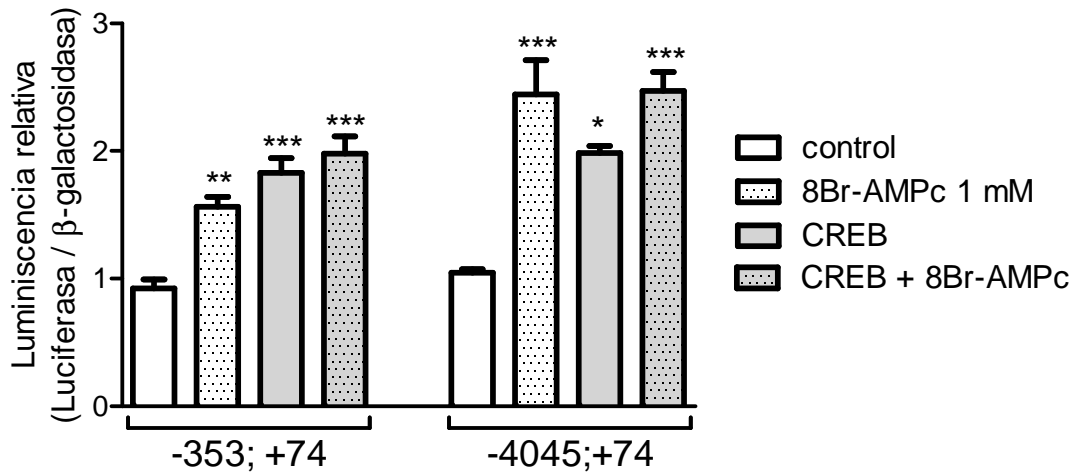
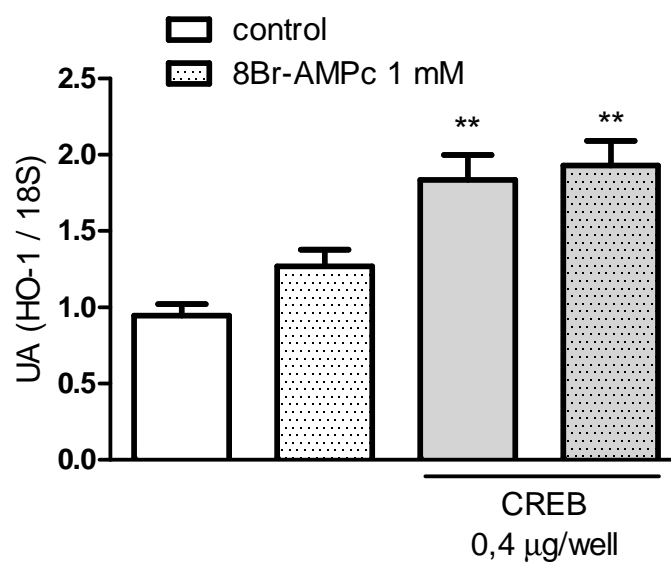


Figura 19: Activación del promotor de HO-1 por CREB. Las células se transfectaron con plásmidos conteniendo los fragmentos -4045;+74 ó -353; +74 del promotor de HO-1 murino y el plásmido de expresión de CREB en relación 1:1 y el de β -galactosidasa y se incubaron durante 24 horas. Luego se trataron con o sin 8Br-AMPC 1 mM durante 24 horas y se determinaron ambas actividades enzimáticas en los homogenatos celulares. Los resultados se muestran como media \pm SEM, N=4, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 vs. control por el test de Tukey.

La Figura 20 muestra los niveles de ARNm y de proteínas de HO-1 en células Y1 que sobreexpresan CREB en presencia o ausencia de 8Br-AMPC 1 mM durante 5 horas. Se observa que la sobreexpresión provoca aumento tanto en los niveles de ARNm como de proteínas de HO-1.

A



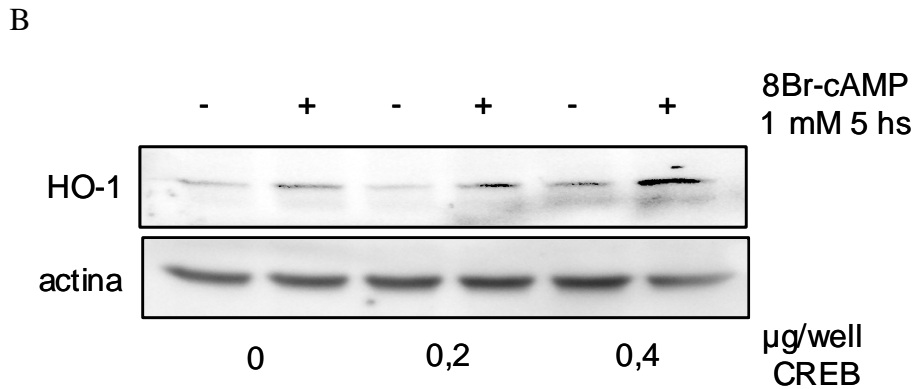


Figura 20: Inducción de HO-1 por sobreexpresión de CREB. Las células se transfectaron con el plásmido de expresión de CREB y se trataron con 8Br-AMPC 1 mM durante 5 horas. Finalizadas las incubaciones las células se trataron con TRIZOL para obtener el ARN y las proteínas totales. Se analizaron los niveles de ARNm por RT-PCR real time para HO-1 y para 18S RNAr (A). Los resultados se muestran como media \pm SEM, N=3, $**p < 0.01$ vs. control por el test de Tukey. En B) se muestra un western blot representativo de los niveles de proteínas de HO-1 y de actina.

Con el fin de confirmar la participación de CREB en la inducción de HO-1 por ACTH/AMPC se utilizó un plásmido que expresa un dominante negativo de CREB, DN-CREB-M1. Este plásmido codifica para una proteína que carece del sitio de activación por fosforilación (serina-133 >Alanina) pero conserva el sitio de unión al ADN. Este dominante negativo compite con la proteína CREB endógena por los sitios de unión al ADN, lo que provoca la inhibición de su actividad.

La Figura 21 muestra que el DN-CREB-M1 bloquea el incremento de la actividad del plásmido reportero CRE/LUC inducida por 8Br-AMPC.

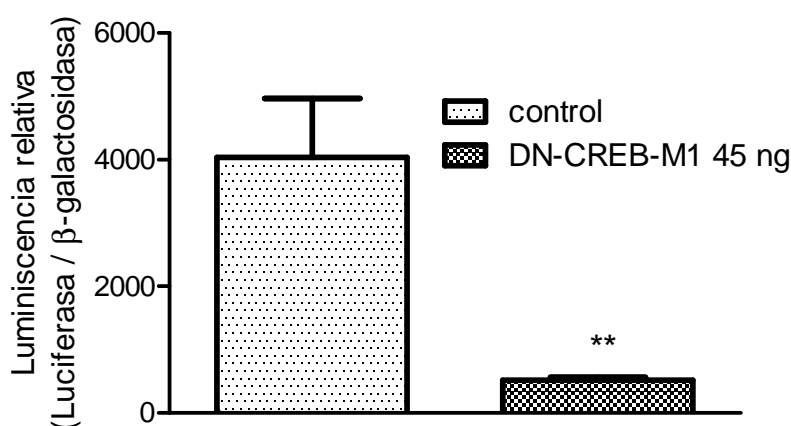


Figura 21: DN-CREB-M1 inhibe la activación de CRE/LUC por AMPC. Las células Y1 se co-transfectaron con los plásmidos CRE/LUC y DN-CREB-M1 ó con el plásmido de expresión vacío (control) y se estimularon con 8Br-AMPC 0.5 mM durante 24 horas. Los resultados se muestran como media \pm SEM, N=4, $**p < 0.01$ vs. control por el test t.

Se analizó a continuación el efecto del dominante negativo sobre la activación del promotor de HO-1 por ACTH. Los resultados indican que el DN-CREB-M1 previene la activación por ACTH de los plásmidos conteniendo los fragmentos -4045;+74 y -353;+74 del promotor (Figura 22).

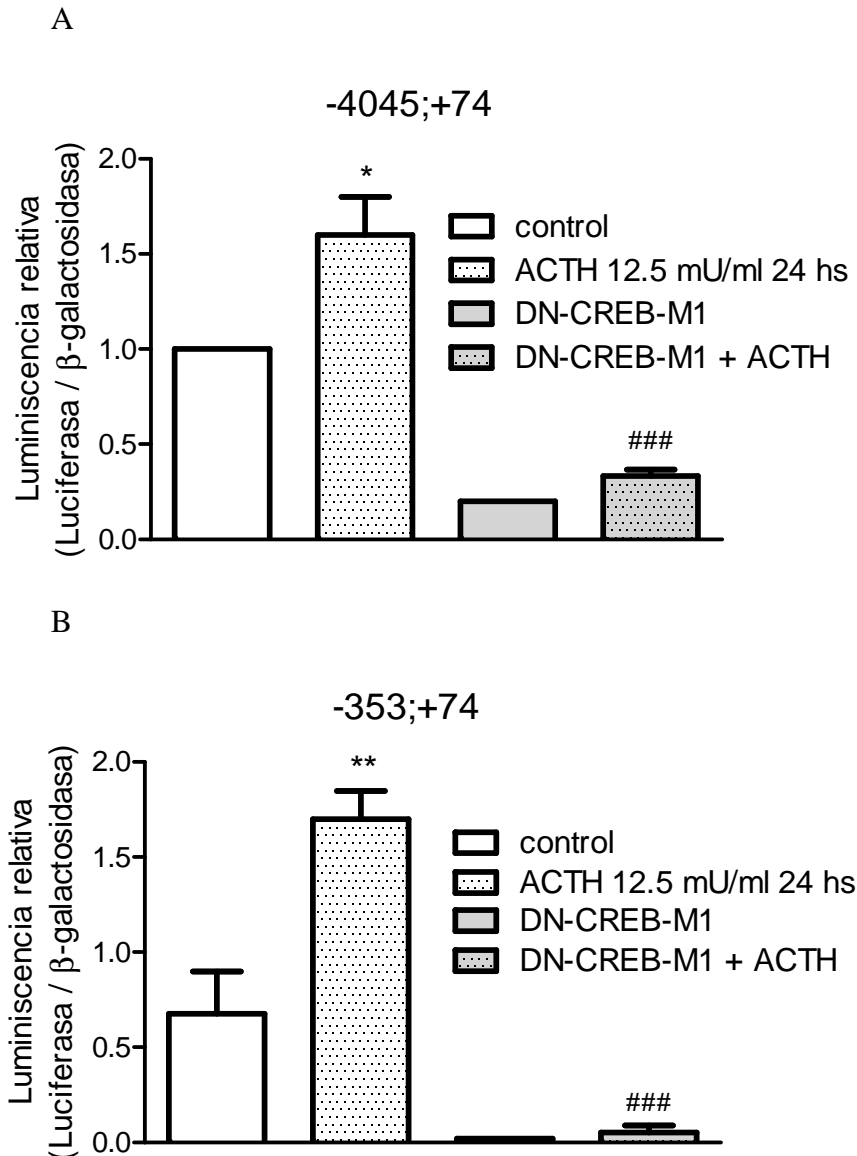
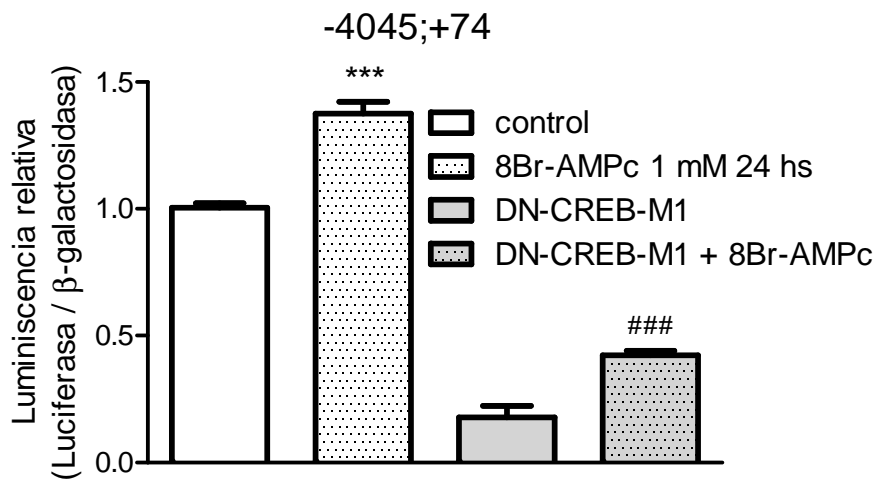


Figura 22: Participación de CREB en la activación del promotor de HO-1 por ACTH. Las células se co-transfectaron con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 (A) o -353;+74 (B) del promotor de HO-1 y con el DN-CREB-M1 o con el plásmido de expresión vacío (control) en relación 1:1 y luego fueron estimuladas durante 24 horas con ACTH 12.5 mU/ml. Los resultados se muestran como media \pm SEM, N=4, **p<0.01 vs. control ###p<0.001 vs. ACTH por el test de Tukey.

El tratamiento con el DN-CREB-M1 también previno la activación por 8Br-AMPC de los plásmidos conteniendo los fragmentos -4045;+74 y -353;+74 del promotor de HO-1 (Figura 23).

A



B

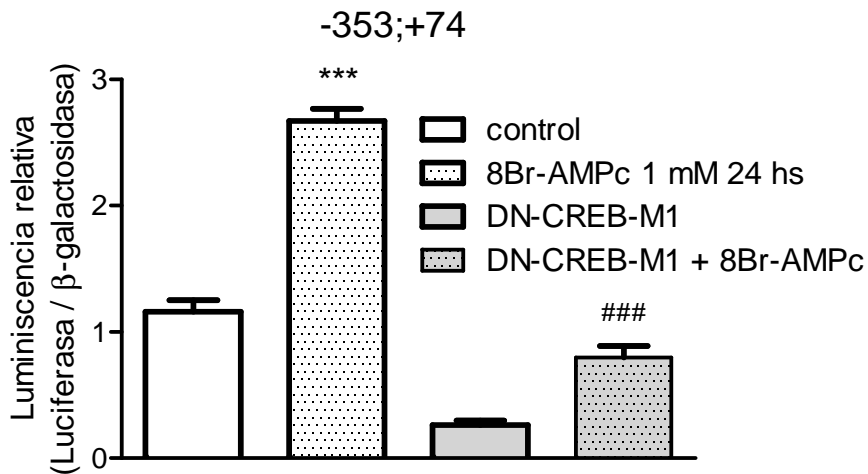


Figura 23: Participación de CREB en la activación del promotor de HO-1 por AMPc. Las células se co-transfectaron con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 (A) o -353;+74 (B) del promotor de HO-1 y con el DN-CREB-M1 o con el plásmido de expresión vacío (control) en relación 1:1 y luego fueron estimuladas durante 24 horas con 8Br-AMPc 1 mM. Los resultados se muestran como media \pm SEM, N=4, *** p <0.01 vs. control ### p <0.001 vs. ACTH por el test de Tukey.

Con respecto a la expresión de HO-1 endógena, la Figura 24 muestra el análisis de los niveles de proteínas de HO-1 en células Y1 que sobreexpresan el DN-CREB-M1 con o sin estimulación por 8Br-AMPc 1 mM durante 5 horas. Se observa que la sobreexpresión del dominante negativo de CREB disminuyó los niveles proteicos de HO-1 tanto en condiciones basales como luego de la estimulación por 8Br-AMPc.

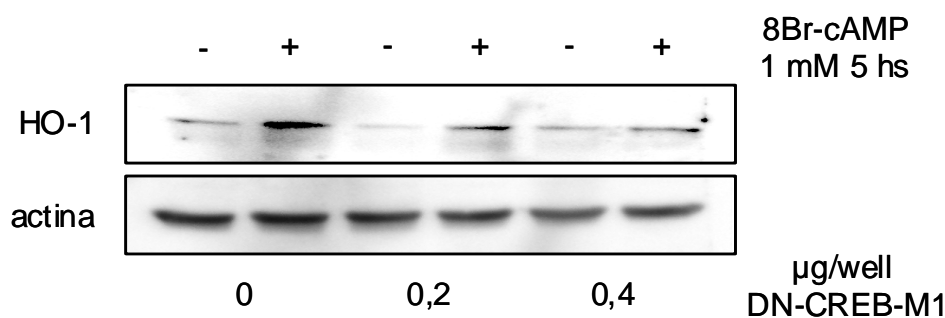


Figura 24: Inducción de HO-1 por la sobreexpresión de DN-CREB-M1. Las células se transfectaron con el plásmido de expresión del DN-CREB-M1 y luego se trataron con 8Br-AMPC 1 mM durante 5 horas. Finalizadas las incubaciones se obtuvieron las proteínas totales, y se analizaron mediante SDS-PAGE con anticuerpos para HO-1 y actina. Se muestra un western blot representativo de dos experimentos independientes.

4.3- Generación de estrés oxidativo por ACTH

Una de las principales vías de inducción de HO-1 involucra la generación de especies reactivas del oxígeno. En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la incubación de células Y1 con ACTH 10 mU/ml durante 1 hora generaba un incremento en los niveles de lipoperóxidos y productos de oxidación de proteínas (carbonilos proteicos) y que el tratamiento con antioxidantes prevenía el aumento en dichos parámetros. En el siguiente grupo de experimentos se estudió la generación de especies reactivas del oxígeno en células Y1 incubadas con ACTH utilizando el reactivo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, que permite detectar especies reactivas del oxígeno (ROS), en particular, anión superóxido y peróxido de hidrogeno. Los resultados mostrados en la Figura 25 indican que ACTH induce un incremento en la generación de ROS en forma dosis y tiempo dependiente.

Por otro lado se analizó la capacidad de respuesta al estímulo oxidante en células Y1 previamente incubadas con ACTH durante 5 horas. Luego del tratamiento, las células fueron expuestas durante 1 hora a H_2O_2/Fe^{2+} y se determinó la generación de ROS. La Figura 25C muestra una disminución en la generación de ROS en las células pre-tratadas con ACTH. En conjunto los resultados presentados indican que el ACTH genera estrés oxidativo en la corteza adrenal, pero también induce sistemas de citoprotección compensatorios.

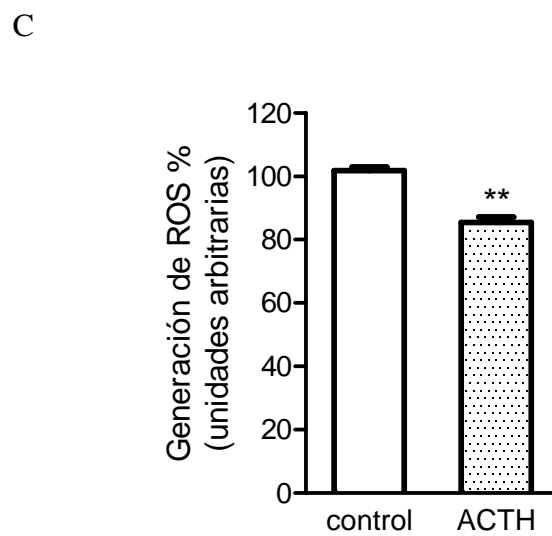
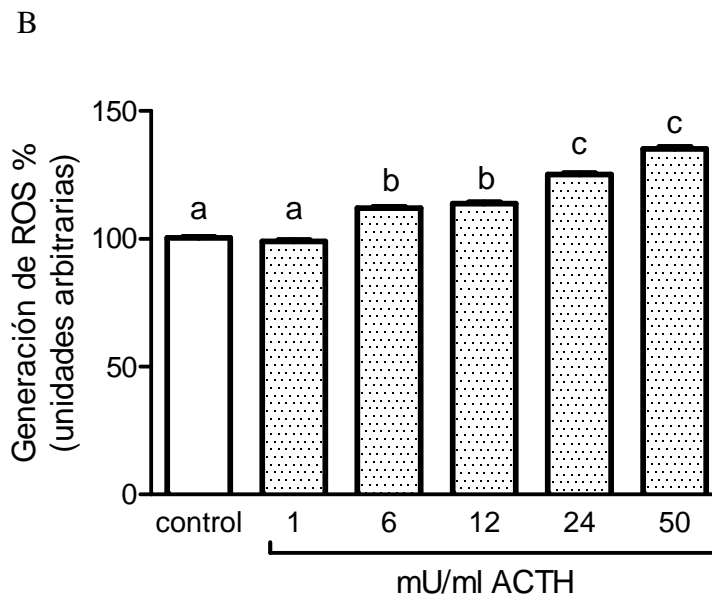
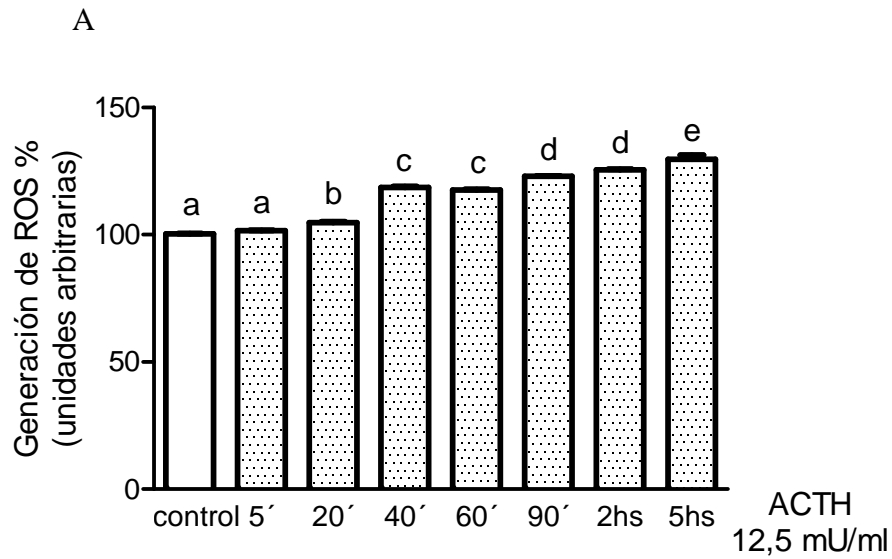


Figura 25: Generación de especies reactivas del oxígeno por ACTH. A) Las células Y1 fueron incubadas en presencia de ACTH 12.5 mU/ml durante los períodos indicados o B) con concentraciones crecientes de ACTH durante 5 horas. Se indican letras diferentes en las columnas significativamente diferentes con un $p < 0.05$ por el test de Bonferroni. C) Células preincubadas con ACTH durante 5 horas fueron expuestas a H_2O_2 100 μ M/ $FeSO_4$ 80 μ M por una hora. Luego de los tratamientos se determinó la producción de ROS con el reactivo DCF-DA. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, ** $p < 0.01$ vs. control por el test t.

4.4- Factores de transcripción dependientes del estado redox celular involucrados en la inducción de HO-1 por ACTH.

Estudiamos el efecto del ACTH sobre la activación del factor NF κ B, uno de los mecanismos por los que se inducen las defensas antioxidantes celulares, utilizando el plásmido reportero κ B/LUC (el cual posee varios sitios de unión a NF κ B río arriba del gen de luciferasa), que se activa fuertemente cuando NF κ B se desplaza al núcleo y se une a estos sitios en los promotores de sus genes blanco. En estos experimentos no se observaron cambios en la actividad de NF κ B cuando las células fueron transfectadas con κ B/LUC e incubadas durante 24 horas con ACTH 12.5 mU/ml (datos no mostrados). Como control positivo mostramos que la sobreexpresión del factor p65 (componente del dímero NF κ B) produce la activación del plásmido κ B/LUC (sección 5.3 Figura 38).

Otra vía de transducción de señales que participa en la inducción de las defensas antioxidantes y detoxificantes celulares es la que involucra al factor de transcripción Nrf2. Ante una injuria oxidativa, este factor se estabiliza en el citoplasma (deja de ser degradado) y se desplaza al núcleo donde induce enzimas antioxidantes de fase II, entre las que se encuentra la HO-1. Para evaluar la activación de este factor, se transfectaron células Y1 con el plásmido reportero Nrf2/LUC (que contiene múltiples sitio de unión a Nrf2 río arriba de un promotor mínimo y del gen de luciferasa) y se estimularon con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPC 0.5 mM durante 24 horas (Figura 26A). No se observaron diferencias significativas en la actividad de éste plásmido con los tratamientos mencionados. Como control positivo, mostramos que la sobreexpresión del factor Nrf2 resultó en la activación del plásmido reportero Nrf2/LUC (Figura 26A).

Se ha descrito que el factor Nrf2 se une a sitios distales del promotor de HO-1 denominados E2 y E1 ubicados aproximadamente a -10Kb y -4Kb del sitio de inicio de la transcripción respectivamente. Con el objeto de evaluar la unión de Nrf2 a estos sitios del promotor de HO-1, se clonó un fragmento de la región E1 (de 533 pb), río arriba del

promotor mínimo del plásmido pGL3 promoter que contiene un promotor mínimo seguido del gen de luciferasa. La Figura 26B muestra que el tratamiento con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPC 0.5 mM no tiene efecto sobre la actividad de este plásmido. Nótese aquí también, que la sobreexpresión de Nrf2 provocó la activación del plásmido conteniendo el enhancer E1.

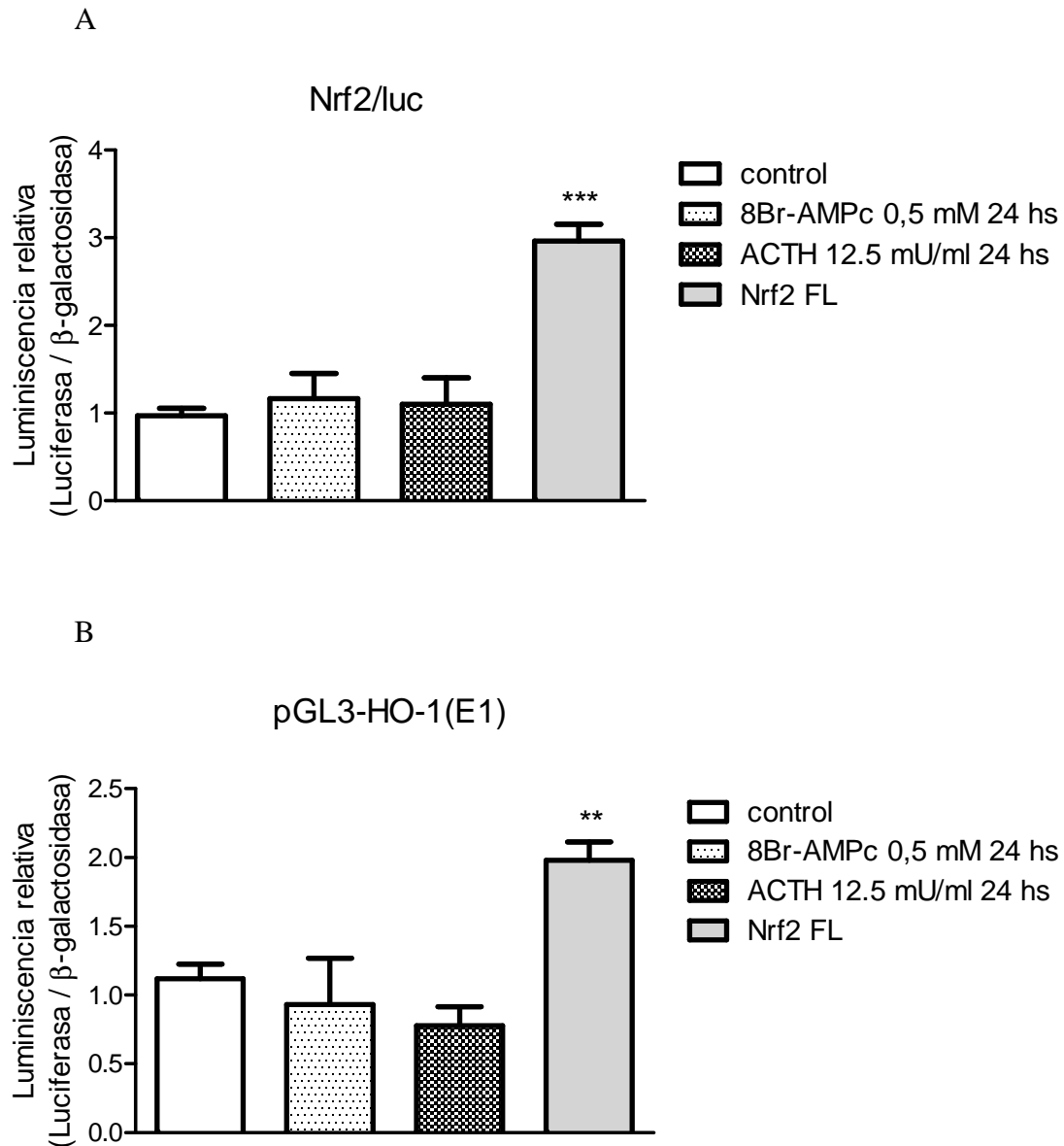


Figura 26: Participación del factor Nrf2 en la vía de señalización de ACTH/AMPC. A) Células Y1 fueron transfectadas con el plásmido reportero Nrf2/LUC y luego tratadas durante 24 horas con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPC 0.5 mM. B) Células Y1 fueron transfectadas con pGL3-HO-1(E1) y tratadas durante 24 horas con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPC 1 mM. Las células se co-transfectaron con los plásmidos reporteros y con un plásmido de expresión para Nrf2 murino en relación 1:1. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, **p<0.01, ***p<0.001 Nrf2 vs. control por el test de Tukey.

Otra vía que puede ser activada por estrés oxidativo es la que involucra al factor de transcripción heterodimérico AP-1, formado por c-Fos y c-Jun. Con el objetivo de analizar la participación de éste factor en la activación del gen de HO-1 por ACTH/AMPc, se transfectaron células Y1 con el plásmido reportero AP-1/LUC (que contiene múltiples sitios de unión a AP-1 en tandem río arriba de un promotor mínimo y del gen de luciferasa) y luego se trataron con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPc 1 mM durante 24 horas (Figura 27). Los resultados muestran que ambos tratamientos incrementaron la actividad del reportero, lo que sugiere que ambos estímulos conducen a la activación de AP-1.

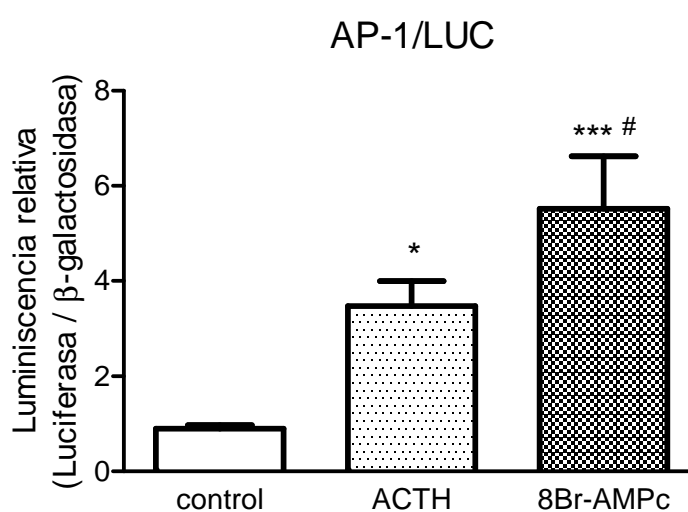
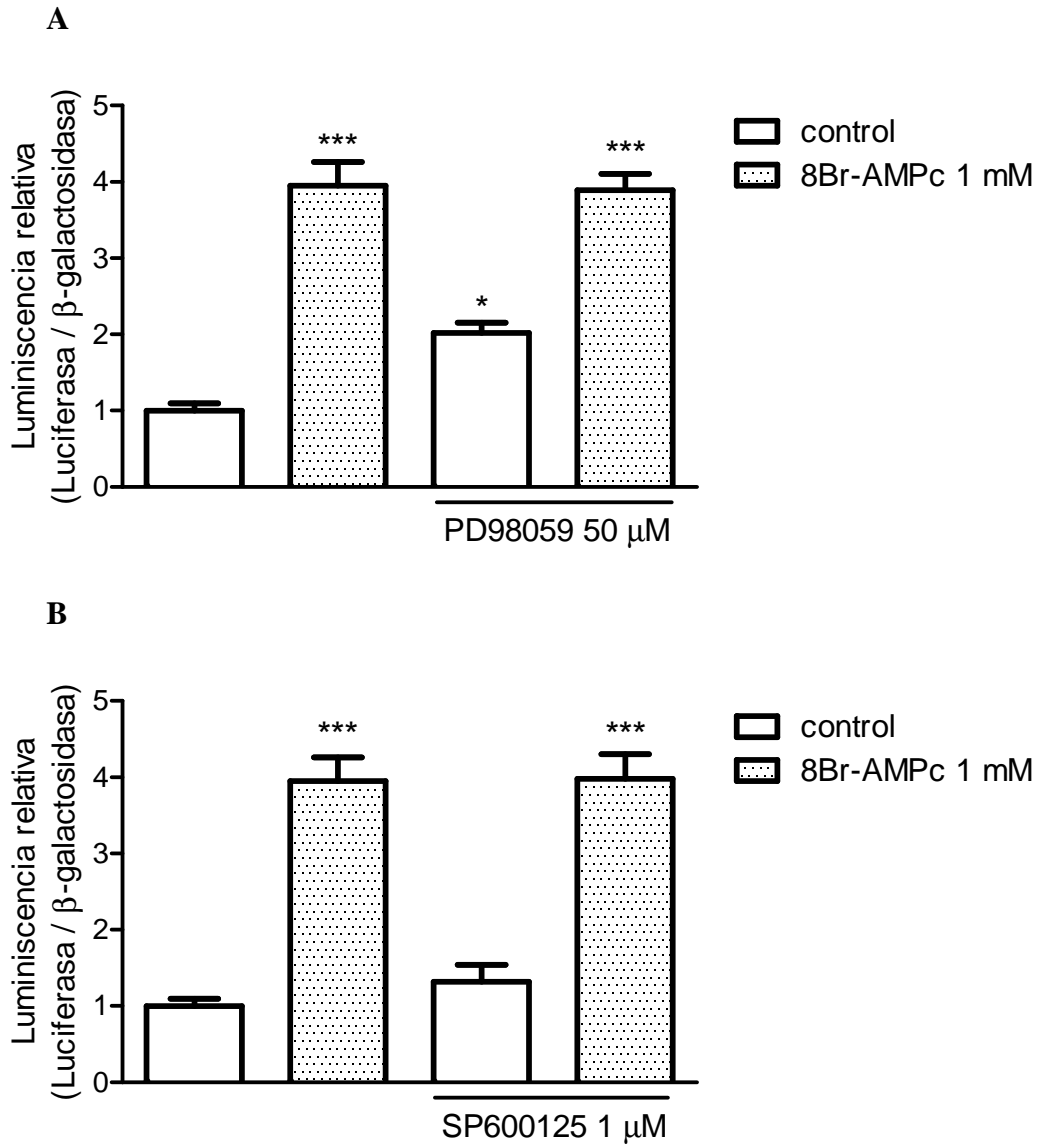


Figura 27: Efecto del ACTH/AMPc sobre la actividad del reportero de AP-1. Las células Y1 fueron transfectadas con el plásmido reportero AP-1/LUC y luego tratadas durante 24 horas con ACTH 12.5 mU/ml u 8Br-AMPc 1 mM. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, *p<0.05, *** p<0.001 vs. control; #p<0.05 vs. ACTH por el test de Tukey.

4.5- Rol de las MAPKs en la inducción de HO-1 por ACTH/AMPc

Una vez determinada la activación del factor AP-1 por ACTH/AMPc, analizamos su participación en el mecanismo de inducción de HO-1. Dado que la activación del factor de transcripción AP-1 es un punto en el que convergen distintas cascadas de activación de MAPKs se analizó la participación de cada una en la activación del promotor de HO-1 (fragmento -353; +74) por ACTH/AMPc. Con este fin se estudió el efecto de inhibidores específicos para las vías ERK1/2 (PD98059 50 μ M), JNK (SP600125 1 μ M) y p38 mapk (SB203580 5 μ M). La Figura 28 muestra la actividad del plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor de HO-1 murino transfectado en células Y1 preincubadas con los inhibidores antes mencionados

y luego tratadas con 8Br-AMPC 1 mM durante 24 horas. El inhibidor de la vía ERK1/2 produjo un incremento en la actividad basal, mientras que no tuvo efecto sobre la actividad estimulada por 8Br-AMPC. Los inhibidores de las vías JNK y p38 no tuvieron efecto sobre la actividad del promotor basal o estimulada por 8Br-AMPC.



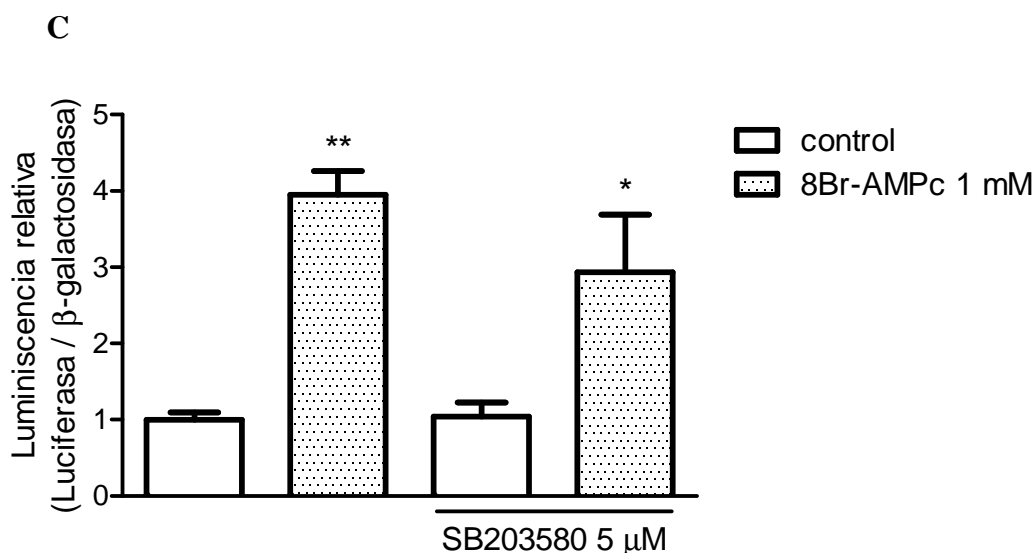
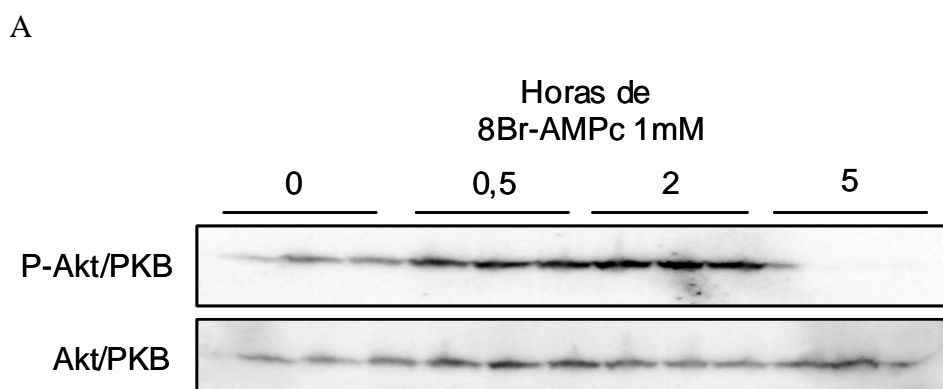


Figura 28: Efecto de inhibidores de MAPKs sobre la actividad del promotor de HO-1. Las células fueron transfectadas con el plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor HO-1 murino y tratadas durante 24 horas con 8Br-AMPC 1 mM en presencia o ausencia de los inhibidores: (A) PD98059 50 μ M, (B) SP600125 1 μ M ó (C) SB203580 5 μ M. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, * p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 vs. control por el test de Tukey.

4.6- Rol de la vía Akt/PKB en la inducción de HO-1 por ACTH/AMPC

Se analizó la participación de la vía Akt/PKB en la inducción de HO-1 por ACTH/AMPC. En primer lugar se estudió el estado de fosforilación de Akt/PKB en distintos intervalos luego del tratamiento con 8Br-AMPC 1 mM. La Figura 29 muestra los niveles proteicos de fosfo-Akt/PKB y Akt/PKB total. Se puede observar que el 8Br-AMPC aumenta el grado de fosforilación de Akt/PKB que alcanza un máximo a las 2 horas y disminuye por debajo de los niveles basales a las 5 horas de tratamiento.



B

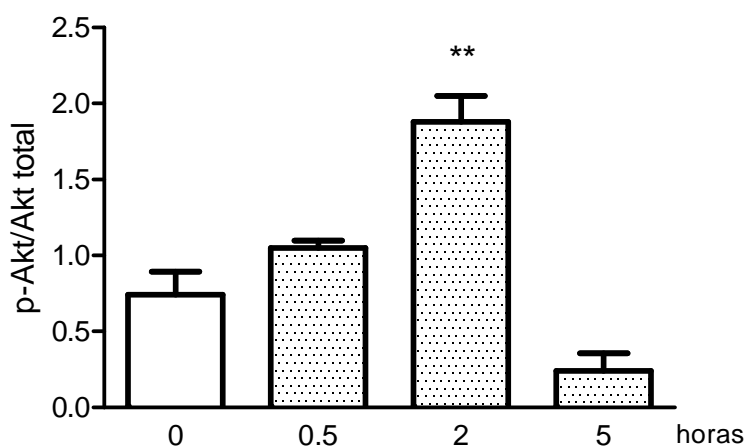


Figura 29: Efecto de 8Br-AMPC sobre la vía Akt/PKB. Las células fueron tratadas durante los tiempos indicados con 8Br-AMPC 1 mM. Terminado el tratamiento, se aislaron las proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos de p-Akt/PKB y Akt/PKB por SDS-PAGE. (A) Western blot representativo. (B) Cuantificación densitométrica de los resultados presentados en (A). Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=3, ** $p < 0.01$ vs. 0h por el test de Tukey.

A continuación se evaluó la participación de la activación de la vía Akt/PKB en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH/AMPC, utilizando un inhibidor específico de la activación de Akt/PKB. En primer lugar se analizó el efecto del inhibidor (wortmanina) sobre la actividad del plásmido reportero CRE/LUC estimulada por 8Br-AMPC 1 mM durante 24 horas. La Figura 30 muestra que el tratamiento con wortmanina previno parcialmente el aumento en la actividad del reportero inducido por 8Br-cAMP. Esto sugiere la existencia de un *cross-talk* entre la vía PKA/CREB y Akt/PKB.

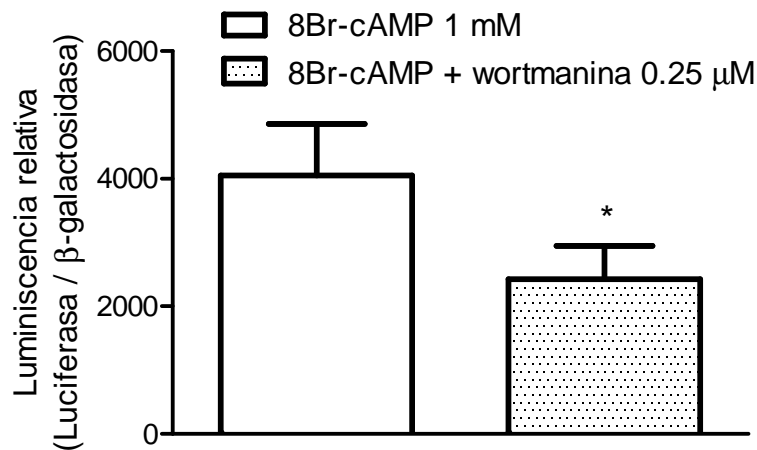


Figura 30: La inhibición de la vía Akt/PKB previene la activación de CREB inducida por 8Br-AMPC. Las células Y1 fueron transfectadas con el plásmido reportero CRE/LUC y luego tratadas durante 24 horas con 8Br-AMPC 1 mM en presencia o ausencia de wortmanina 0,25 μM. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=4, *p<0.05 vs. 8Br-AMPC por el test de t.

Se estudió entonces la relación de la vía Akt/PKB con la activación del promotor de HO-1 por ACTH/AMPC. Con este fin, las células Y1 fueron transfectadas con el plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor de HO-1 murino y luego tratadas con 8Br-AMPC 1 mM en presencia o ausencia de wortmanina 0.25 μM. En la Figura 31 se puede apreciar que el tratamiento con el inhibidor previno significativamente la activación del promotor.

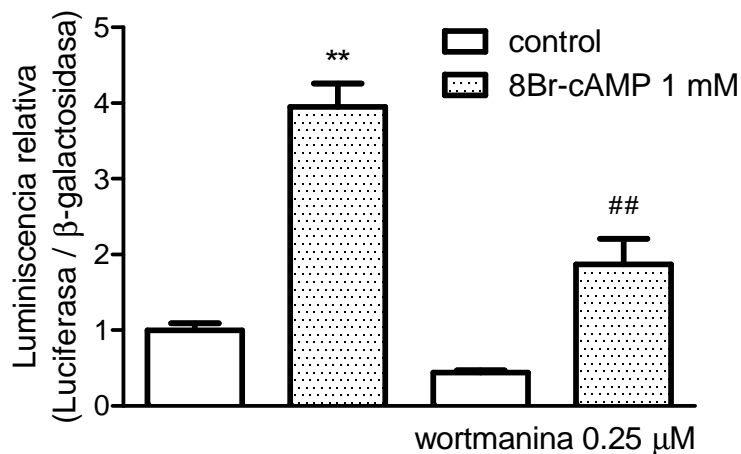


Figura 31: La inhibición de la vía Akt/PKB previene la activación del promotor de HO-1 inducida por 8Br-AMPC. Las células fueron transfectadas con el plásmido conteniendo el fragmento -353;+74 del promotor HO-1 murino y tratadas durante 24 horas con 8Br-AMPC 1 mM en presencia o ausencia de wortmanina 0,25 μM. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=4, ** p<0.01 vs. Control; ## p<0.01 vs. 8Br-AMPC, por el test de Tukey.

Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron los niveles de ARNm de HO-1 endógenos (Figura 32).

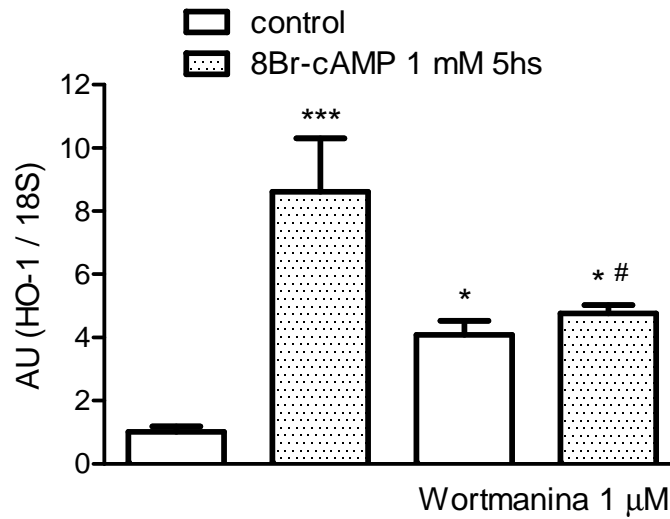


Figura 32: La inhibición de la vía Akt/PKB previene la inducción de HO-1 inducida por 8Br-AMPC. Las células fueron peincubadas con wortmanina 1 μ M durante 30 minutos y luego tratadas con 8Br-AMPC 1 mM durante 5 horas. Se obtuvo el ARN total con el reactivo de Trizol y se analizaron los niveles de ARNm de HO-1 y ARNr 18S por RT-PCR en tiempo real. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, *** p<0.001, * p<0.05 vs. control; # p<0.05 vs. 8Br-AMPC por el test de Tukey.

5- Efecto del LPS sobre la expresión de HO-1

Trabajos previos de nuestro laboratorio indicaron que el tratamiento *in vivo* con LPS induce un aumento en la concentración de corticosterona en suero y en los niveles de expresión de HO-1 en la corteza adrenal de ratas [2]. Posteriormente demostramos efectos directos del LPS en células adrenales, ya que la incubación de células de la línea adrenocortical murina Y1 con LPS (10 µg/ml durante 24 horas) indujo un aumento en los niveles de expresión de COX-2 y en la concentración de esteroides en el medio de cultivo [90].

El objetivo del siguiente grupo de experimentos fue estudiar los efectos del LPS sobre la expresión de HO-1 en células Y1.

5.1- Inducción de HO-1 por LPS

Se analizó en primer lugar el efecto del LPS sobre la expresión de HO-1 en las células Y1. Para esto se incubaron las células con LPS 10 µg/ml durante distintos períodos y se analizaron los niveles proteicos de HO-1 por western blot. En la Figura 33 se puede observar un aumento significativo en los niveles proteicos de HO-1 entre las 4 y 24 horas de incubación.

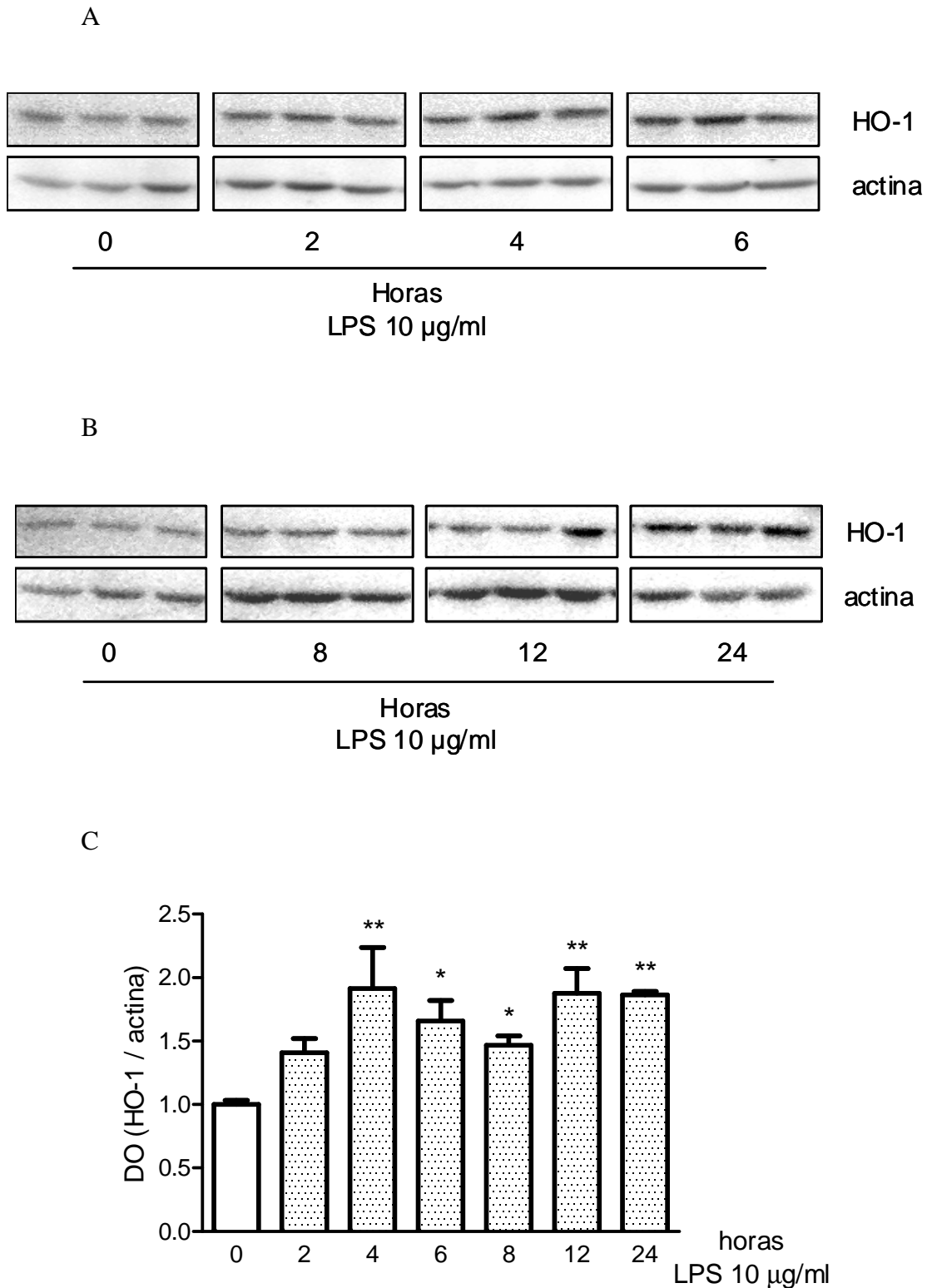


Figura 33: Efecto del LPS sobre la expresión de HO-1. Las células Y1 fueron tratadas con LPS 10 µg/ml durante los períodos indicados. Finalizada la incubación se analizaron las proteínas por SDS-PAGE y western blot para HO-1 y actina. (A) Western blot representativo mostrando los niveles de HO-1/actina luego de 0, 2, 4 y 6 horas de tratamiento, (B) Western blot representativo mostrando los niveles de HO-1/actina luego de 0, 8, 12 y 24 horas de tratamiento. (C) Cuantificación densitométrica de los resultados mostrados en las Figuras A y B. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=3, * p <0.05 vs. 0, ** p <0.01 vs. 0 por el test de Tukey.

Se analizaron también los niveles proteicos de HO-1 luego de la incubación de las células Y1 con dosis crecientes de LPS durante 24 horas (Figura 34).

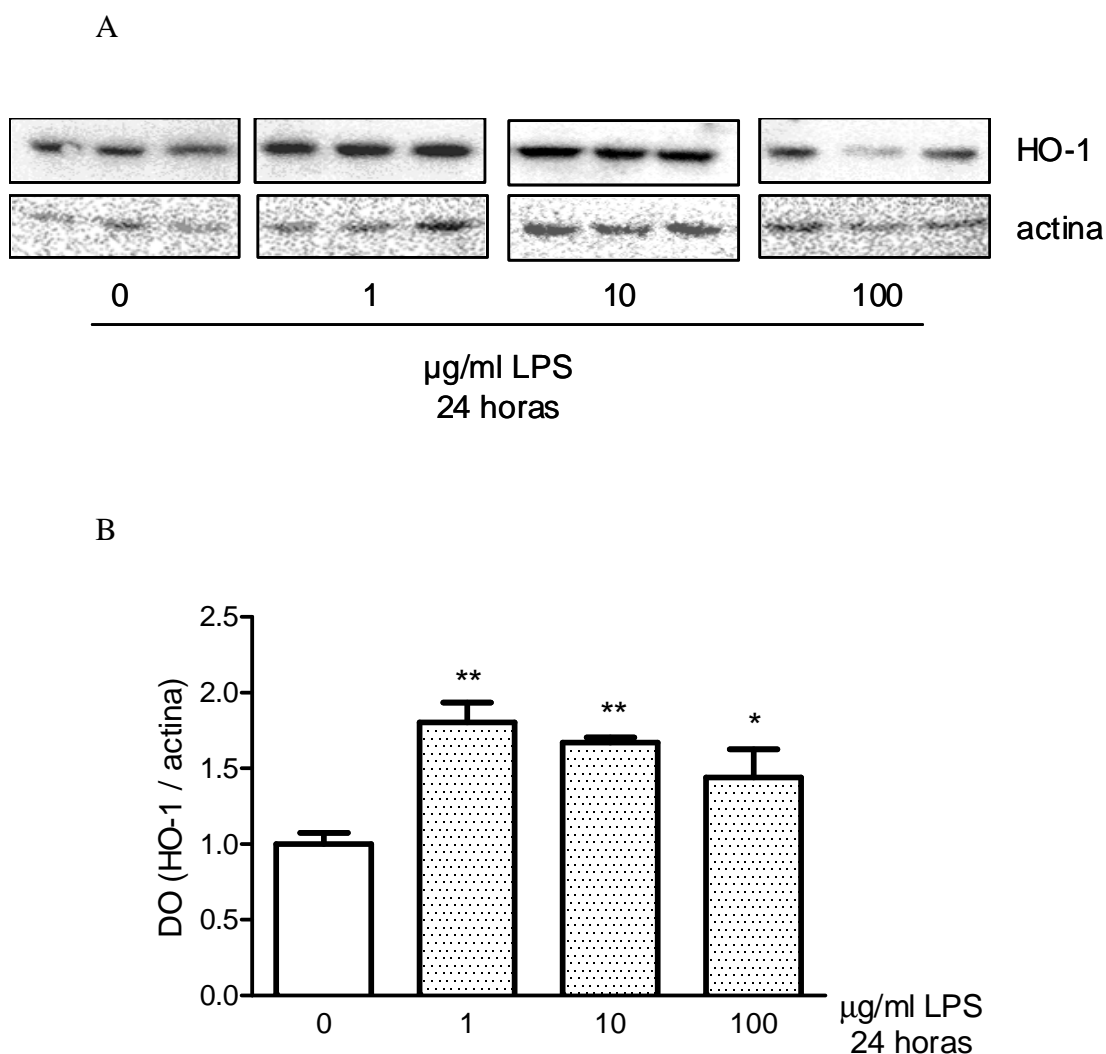


Figura 34: Efecto de concentraciones crecientes de LPS sobre los niveles proteicos de HO-1. Luego de la incubación de las células Y1 con las dosis indicadas de LPS durante 24 horas se extrajeron las proteínas totales y se analizaron por western blot para HO-1 y actina. (A) Western blot representativo, (B) Cuantificación densitométrica de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 por el test de Tukey.

5.2- Actividad del promotor de HO-1

Para analizar la activación del promotor de HO-1 por LPS se utilizaron las construcciones del promotor murino de HO-1 clonadas en el vector pGL2 ya mencionadas en la sección anterior. Las células fueron transfectadas en forma transitoria con las siguientes construcciones: -4045;+74, -3216; +74, 2700; +74, -2050;+74, -

1200;+74 y -353; +74 y luego de la incubación con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas se evaluó la actividad de luciferasa en los homogenatos celulares. Los resultados, mostrados en la Figura 35 indican que el LPS induce un aumento significativo en la actividad del plásmido conteniendo 4 kb del promotor de HO-1 y que dicha activación no se detecta en los fragmentos -2700;+74 y más cortos, lo que sugiere que el/los posibles elementos de respuesta al LPS se localizan en una zona ubicada entre -3216 y -2700 pb río arriba del inicio de la transcripción. El análisis *in silico* (Transfact, Genomatix) de esa zona del promotor permitió identificar 372 sitios de unión para familias de factores de transcripción. Entre ellos podemos nombrar los que han sido relacionados con los mecanismos de señalización del LPS, por ejemplo, NF κ B, IRFs, AP-1, Nrf2, ETs, GATA, entre otros.

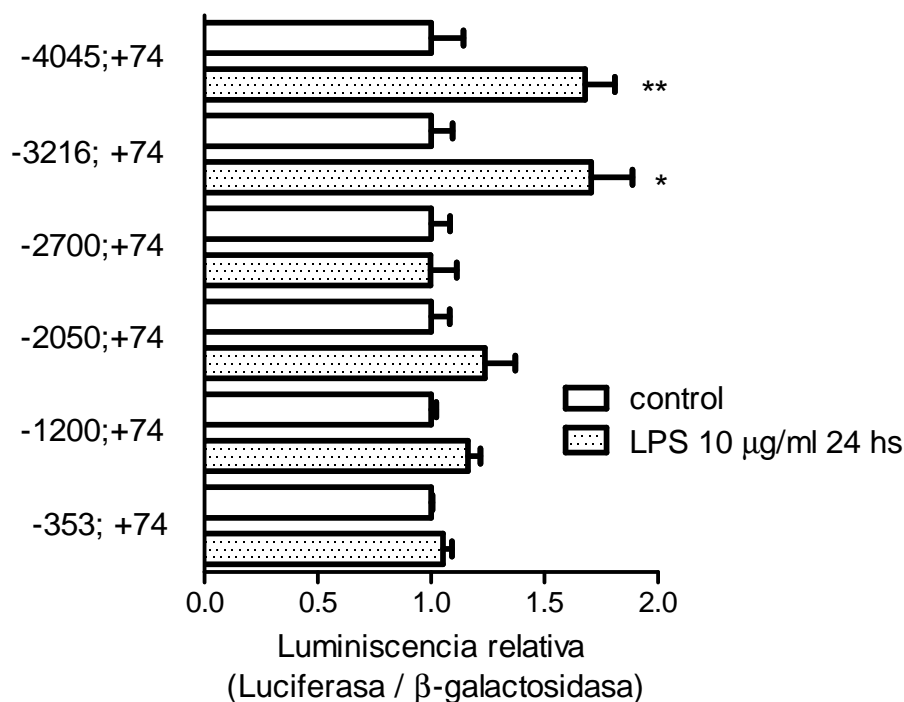


Figura 35: Localización de los sitios de respuesta al LPS en el promotor de HO-1. Las células Y1 fueron transfectadas con construcciones conteniendo distintos fragmentos de promotor de HO-1 y luego incubadas en ausencia (barras claras) o presencia de LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas (barras oscuras). Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, * p <0.05, ** p <0.01 vs. el control respectivo por el test t.

5.3- Participación de la vía NFκB en la inducción de HO-1 por LPS.

La vía de señalización de LPS involucra su unión a receptores de membrana (TLR2/4), lo que desencadena la activación de diferentes vías de transducción de señales. Entre los factores de transcripción activados por LPS se cuenta NFκB, que luego de la degradación de IκB se desplaza al núcleo activando la transcripción de distintos genes blanco entre los que se incluye a HO-1.

Con el fin de evaluar la activación de NFκB en las células Y1 luego del tratamiento con LPS se transfectaron las células con el plásmido reportero κB/LUC y se estudió su activación luego de la incubación con LPS 10 μg/ml durante 24 horas en presencia o ausencia del inhibidor PS1145 10 μM (inhibidor de la quinasa IKK que fosforila a IκBα y desencadena su degradación). Los resultados, mostrados en la Figura 36, indicaron que el tratamiento con LPS incrementa significativamente la actividad del plásmido y que dicho incremento fue prevenido por el tratamiento con el inhibidor PS1145.

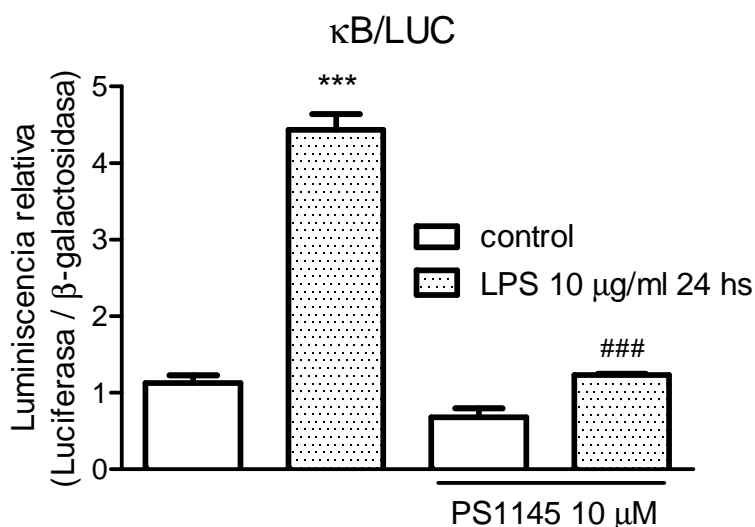
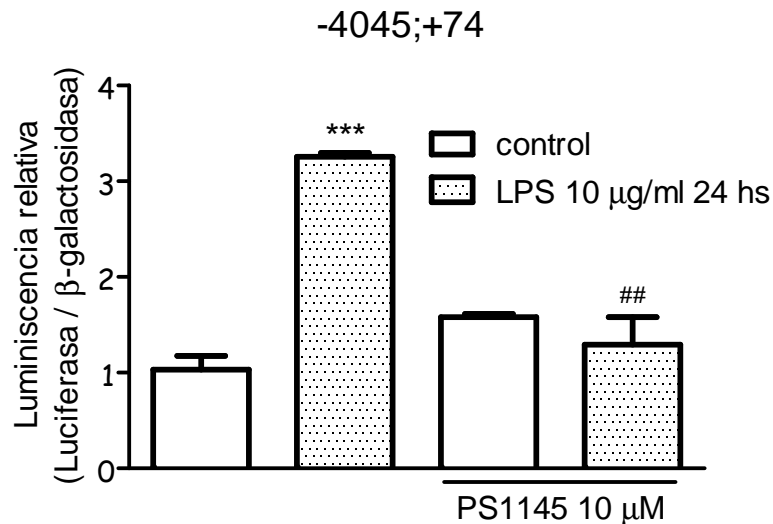


Figura 36: Efecto del LPS sobre la actividad de NFκB. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero κB/LUC y luego tratadas con LPS 10 μg/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de PS1145 10 μM. Se midieron las actividades enzimáticas en homogenatos celulares obtenidos luego del tratamiento. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=6, *** p<0.001 vs. control, ### p<0.001 vs. LPS 10 μg/ml 24 horas por el test de Tukey.

A continuación se evaluó la participación de la vía de NFκB en la activación del promotor de HO-1 por LPS. Con este fin, se incubaron células Y1, transfectadas con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74, con LPS 10 μg/ml durante 24 horas,

en presencia o ausencia del inhibidor PS1145 10 μ M. La Figura 37 indica que el tratamiento con el inhibidor bloquea tanto la activación del promotor de HO-1 (Figura 37A) como el aumento en los niveles proteicos de HO-1 por LPS (Figura 37B), lo que sugiere la participación de NF κ B en el mecanismo de inducción de HO-1 por LPS.

A



B

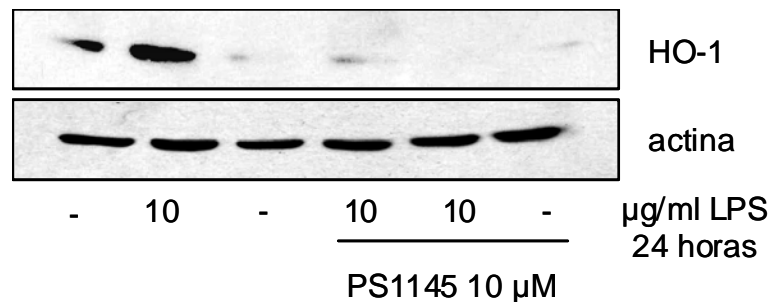
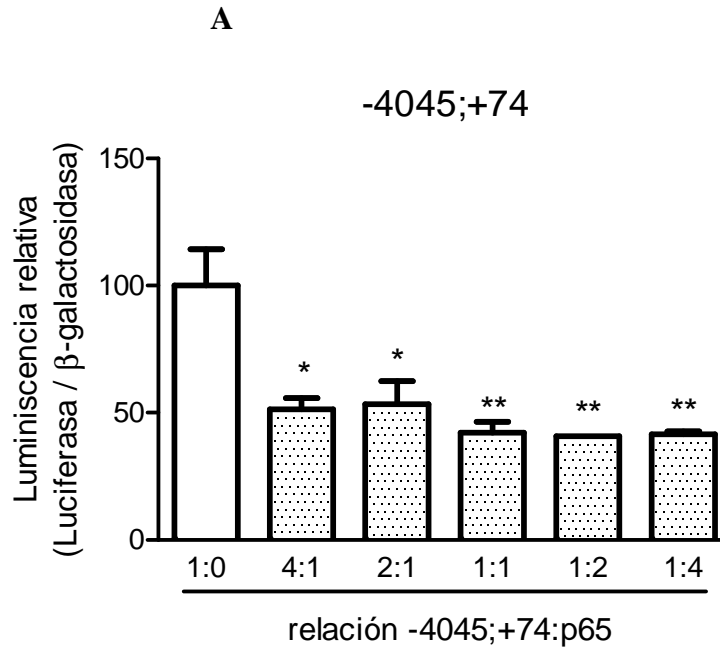


Figura 37: Participación de NF κ B en la inducción de HO-1 por LPS. A) Las células Y1 fueron transfectadas con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 del promotor de HO-1 y luego tratadas con LPS 10 μ g/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de PS1145 10 μ M. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=6, ***p<0.001 vs. control, ##p<0.001 vs. LPS 10 μ g/ml 24 horas, por el test de Tukey. B) Las células Y1 fueron incubadas como en A) y luego se analizaron las proteínas por western blot para HO-1 y actina. Se muestra un western blot representativo.

En otra serie de experimentos se estudió el efecto de la sobreexpresión de la subunidad p65 de NF κ B sobre la actividad del plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 del promotor de HO-1. La Figura 38A muestra que la sobreexpresión de p65 inhibió la actividad del promotor de HO-1 en todas las concentraciones ensayadas.

Como control del experimento se determinó que la sobreexpresión de p65 incrementó la actividad del plásmido reportero para NFκB (Figura 38B).



B

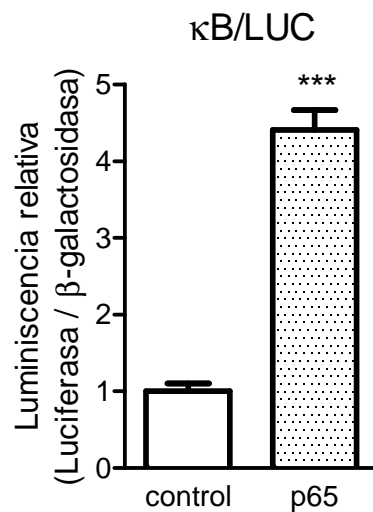


Figura 38: Sobreexpresión de p65 en células Y1. Las células fueron co-transfectadas con el plásmido de expresión de p65 y con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 del promotor de HO-1 en las relaciones indicadas (A) ó con el reportero κB/LUC en relación 1:1 (B). Luego de 36 horas se determinaron las actividades enzimáticas en homogenatos celulares. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=3, *** p<0.001 vs. control (plásmido de expresión vacío) por el test t; * p<0.05, ** p<0.01 vs .1:0 por el test de Tukey.

5.4- Participación de la vía AMPc/PKA/CREB en la inducción de HO-1 por LPS

En primer lugar se analizó la participación de la actividad de PKA en la activación del promotor de HO-1 por LPS. Se transfectaron las células Y1 con el plásmido conteniendo el fragmento de -4045;+74 y se las trató con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas en presencia del inhibidor de PKA (H89 10 μM). La Figura 39 muestra que el inhibidor bloquea completamente la activación del plásmido por LPS.

El tratamiento con LPS durante 24 horas, no afectó la actividad del plásmido reportero para CRE/LUC (datos no mostrados).

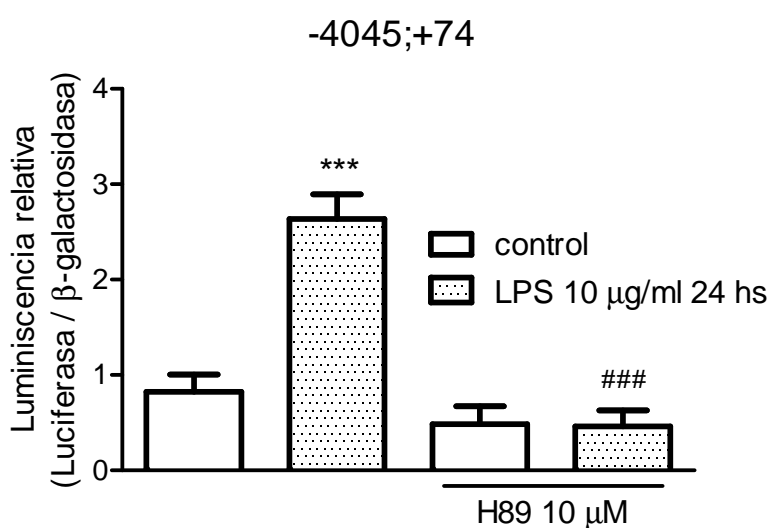


Figura 39: Participación de la vía de AMPc/PKA en la activación del promotor de HO-1 por LPS. Se transfectaron células Y1 con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 del promotor de HO-1 murino y el plásmido de expresión de β -galactosidasa. Las actividades enzimáticas se evaluaron luego de la incubación con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas en presencia o ausencia de H89 10 μM . Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, *** p <0.001 vs. control, ### p <0.01 vs. LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ por el test de Tukey.

5.5- Participación del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de LPS

La siguiente serie de experimentos se diseñó con el fin de determinar si el tratamiento con LPS producía estrés oxidativo en las células Y1 y si esto podría relacionarse con la activación de la vía de NF κ B.

Se estudió entonces la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células Y1 tratadas con LPS. Los resultados mostrados en la Figura 40 indicaron que el LPS induce un aumento significativo en la producción de ROS desde los 15 minutos hasta las 24 horas de iniciado el tratamiento.

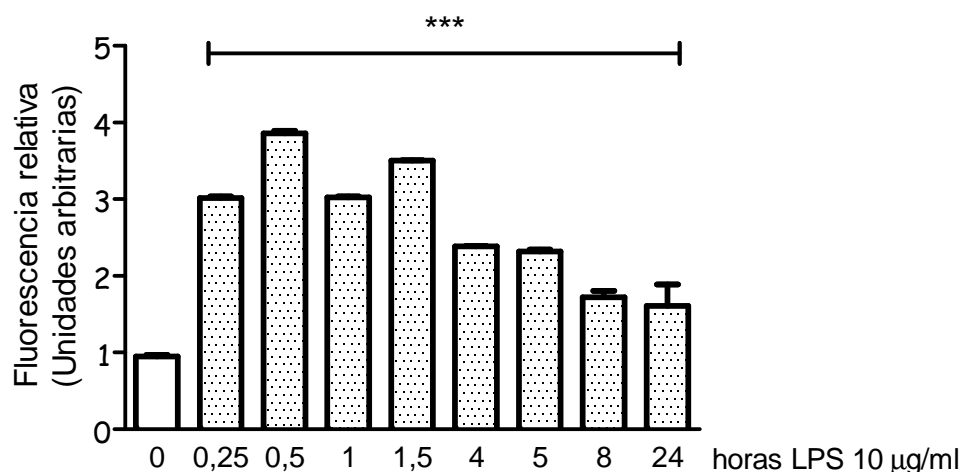


Figura 40: Efecto del LPS sobre la generación de especies reactivas del oxígeno. Las células Y1 fueron tratadas con LPS 10 µg/ml durante distintos períodos. Luego se agregó al medio el reactivo DCF-DA 100 µM, se incubó durante 30 minutos, se realizaron lavados con PBS y se midió la fluorescencia como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=6, *** p<0.001 vs. 0, por el test de Dunnett.

Uno de los principales radicales libres que se producen en el microambiente intracelular es el radical anión superóxido. Dado que una de las fuentes de anión superóxido es la actividad del complejo NADPH oxidasa se analizó su participación en la activación de NFκB por LPS. Se transfectaron células Y1 con el plásmido reportero κB/LUC y se trataron con LPS 10 µg/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de un inhibidor específico del complejo NADPH oxidasa. La Figura 41A muestra que el tratamiento con el inhibidor apocinina 50 µM evitó ligera pero significativamente la activación del plásmido reportero de NFκB por LPS.

En otra serie de experimentos se evaluó la activación del promotor de HO-1 y los niveles proteicos de HO-1 luego del tratamiento con LPS 10 µg/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de apocinina 50 µM. No se observaron diferencias en los efectos del LPS sobre la activación del promotor (Figura 41B) o sobre los niveles proteicos de HO-1 (Figura 41C) cuando las células se trataron con apocinina. Estos resultados sugieren que la actividad de NADPH oxidasa no está involucrada en la inducción de HO-1 por LPS en células Y1.

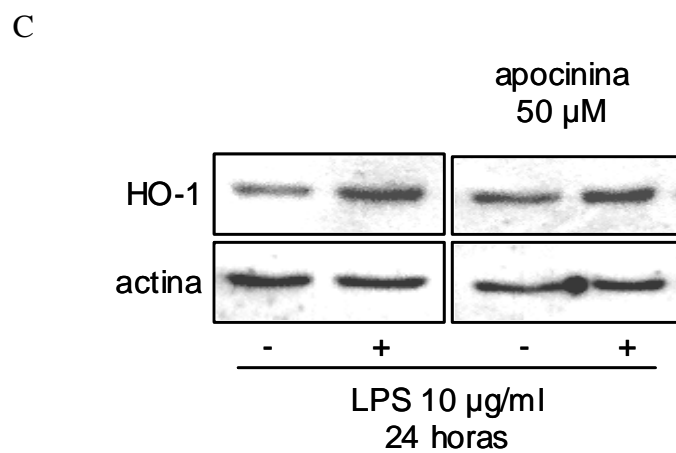
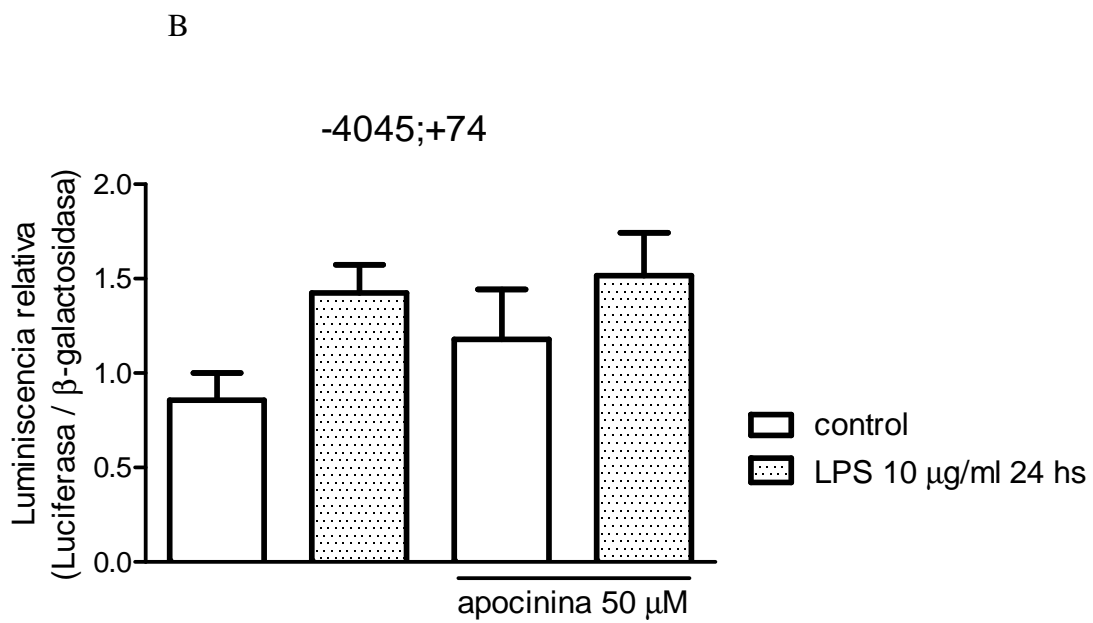
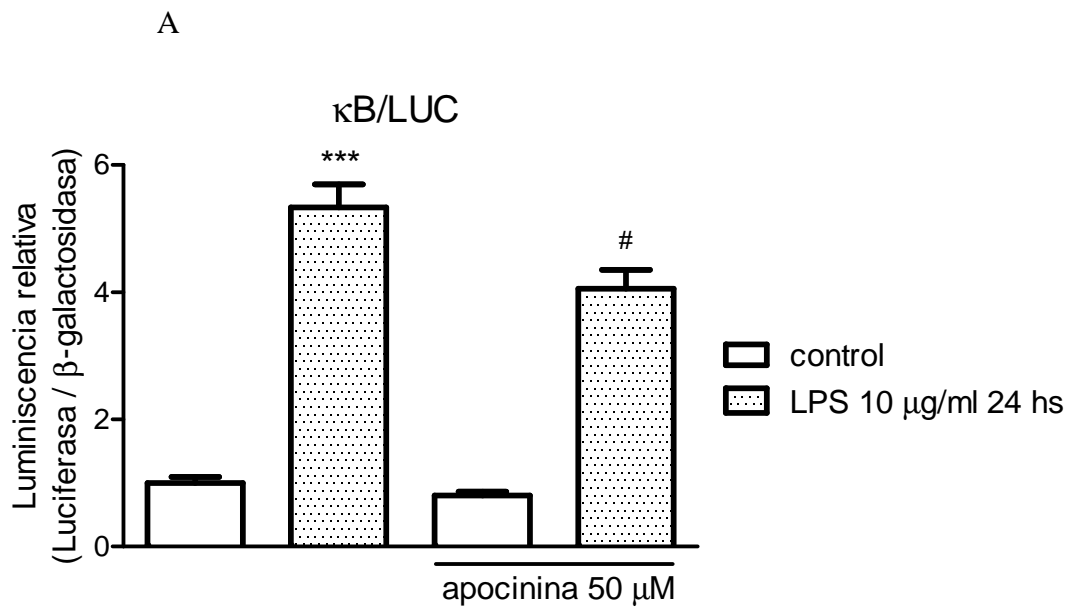


Figura 41: Participación de la actividad de NADPHox en la activación de NFκB por LPS.

Las células fueron preincubadas con apocinina 50 μM y luego tratadas con LPS 10 μg/ml durante 24 horas. A y B) Se midió la actividad de luciferasa/β-galactosidasa en homogenatos de células transfectadas con κB/LUC o con el plásmido conteniendo el fragmento -4045;+74 del promotor de HO-1. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=4, ***p<0.001 vs. control; #p<0.05 vs. LPS en ausencia de apocinina por el test de Tukey. C) Las células Y1 se incubaron como en A) y B) y se analizaron las proteínas por western blot para HO-1 y actina. Se muestra un western blot representativo.

Con el objeto de analizar la participación del estrés oxidativo en la activación del factor NFκB, se transfectaron células con el reportero κB/LUC y se trataron con LPS, en presencia y ausencia de los siguientes antioxidantes: ácido ascórbico 100 μM, bilirrubina 1 μM y alfa tocoferol 100 μM. La Figura 42 muestra que ninguno de los antioxidantes utilizados tuvo efecto sobre la activación del reportero por LPS.

En forma análoga, el tratamiento con antioxidantes tampoco tuvo efecto sobre el incremento en los niveles proteicos de HO-1 por LPS (datos no mostrados).

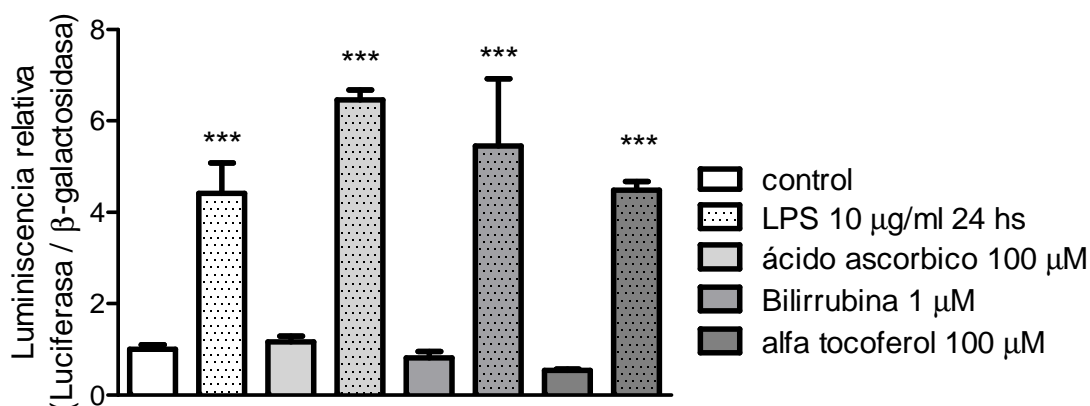


Figura 42: Efecto de antioxidantes sobre la activación de NFκB por LPS. Las células Y1 fueron transfectadas con el reportero KB-LUC, pre-incubadas con ácido ascórbico 100 μM, bilirrubina 1 μM o alfa-tocoferol 100 μM durante 30 minutos y luego tratadas con LPS 10 μg/ml durante 24 horas. Luego de este período se midieron ambas actividades enzimáticas en homogenatos celulares. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con LPS. Los resultados se expresan como media ± SEM, N=4, ***p<0.001 vs. su control respectivo por el test de Tukey.

5.6- Participación de MAPKs

Por último se analizó la participación de las vías de MAPKs sobre la activación del factor NFκB. Para esto se utilizaron inhibidores específicos para ERK1/2 (PD98059 10 μM), JNK (SP600125 5 μM) y p38 (SB203580 5 μM). La Figura 43A muestra la actividad del plásmido reportero κB/LUC en células preincubadas con los inhibidores antes mencionados y tratadas con LPS 10 μM durante 24 horas. Ninguno de los

inhibidores tuvo efecto significativo sobre la activación de κ B/LUC por LPS. Los inhibidores utilizados tampoco afectaron el efecto estimulador del LPS sobre la actividad del promotor, ni sobre los niveles proteicos de HO-1 (datos no mostrados). No obstante se observó un efecto estimulador *per se* del inhibidor PD98059 sobre los niveles proteicos de HO-1 (Figura 43B).

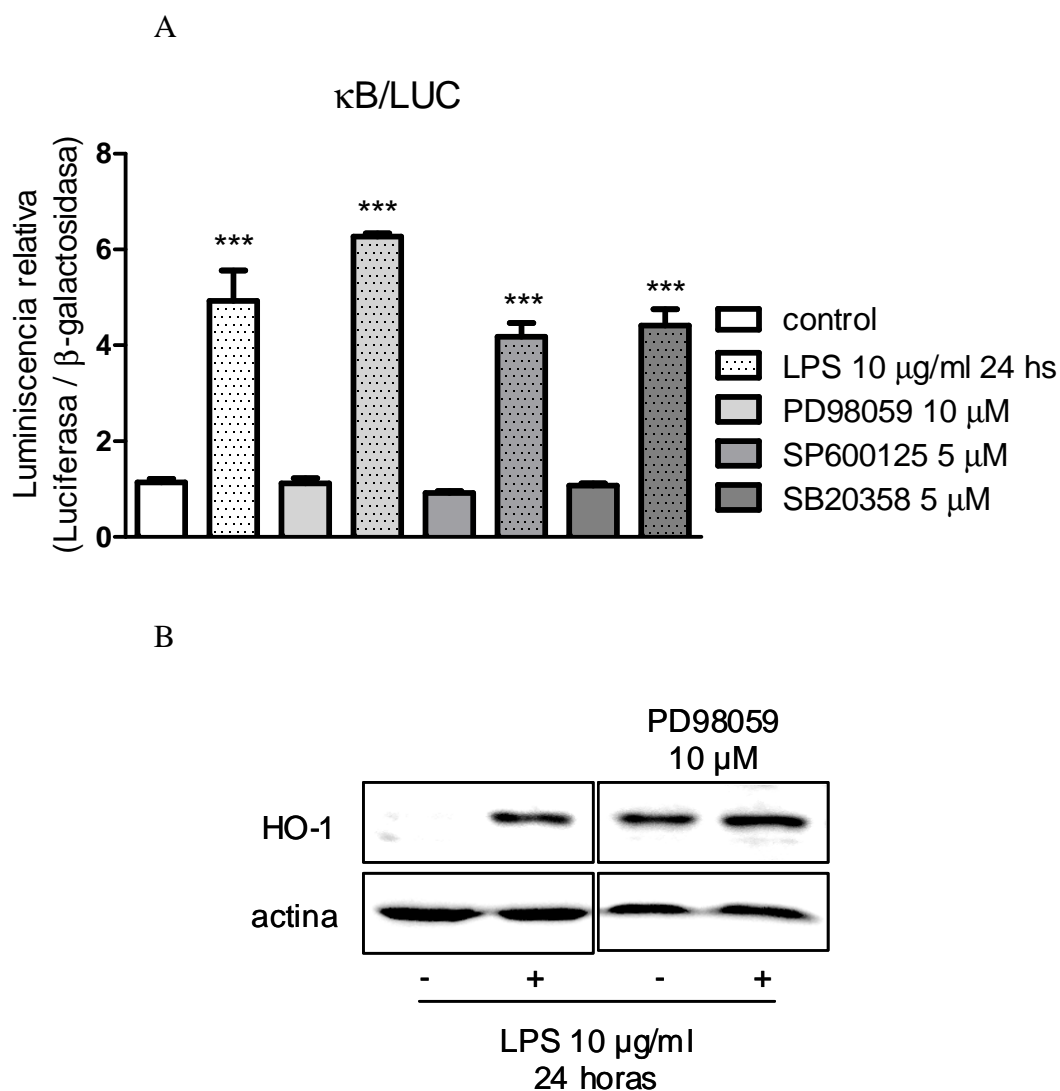


Figura 43: Efecto de inhibidores de MAPKs sobre la actividad de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y la expresión de HO-1 inducida por LPS. Las células fueron transfectadas con el plásmido reportero κ B/LUC y tratadas durante 24 horas con LPS 10 μ g/ml en presencia o ausencia de los inhibidores PD98059 10 μ M, SP600125 5 μ M ó SB203580 5 μ M. Se midió la actividad de luciferasa/ β -galactosidasa en homogenatos celulares. Los resultados se expresan como media \pm SEM, N=4, *** p<0.001 vs. control respectivo solamente por el test de Tukey (A). Se analizaron las proteínas de HO-1 y actina por western blot en células tratadas durante 24 horas con LPS 10 μ g/ml en presencia o ausencia del inhibidor PD98059 10 μ M (B). Se muestra un western blot representativo.

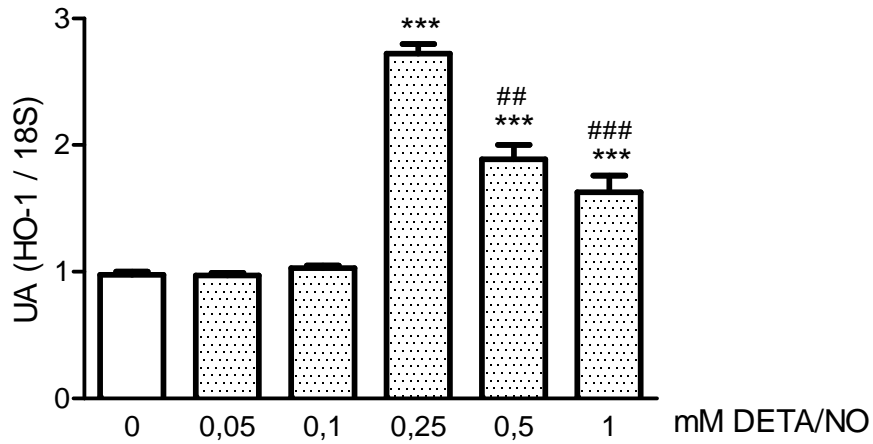
6- Efecto del Óxido Nítrico sobre la expresión de HO-1

6.1- Inducción de HO-1 por DETA/NO

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que la inducción de HO-1 por LPS en corteza adrenal de rata era bloqueada por el tratamiento con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS). De acuerdo a esos resultados el objetivo de los siguientes experimentos fue estudiar la participación del óxido nítrico (NO) en el mecanismo de inducción de HO-1 en células de corteza adrenal.

En estos experimentos se utilizó el generador de NO, dietilentriamina/óxido nítrico (DETA/NO), para el tratamiento de las células Y1. Las Figuras 44 y 45 muestran que la incubación con el dador de NO produjo un aumento en los niveles de ARNm que alcanzó un máximo con 0,25 mM del dador y fue significativo a partir de las 5 horas de tratamiento. El análisis por western blot muestra que el incremento en los niveles proteicos de HO-1 es evidente a partir de una concentración de 0,25 mM del dador y desde las 5 horas de tratamiento.

A



B

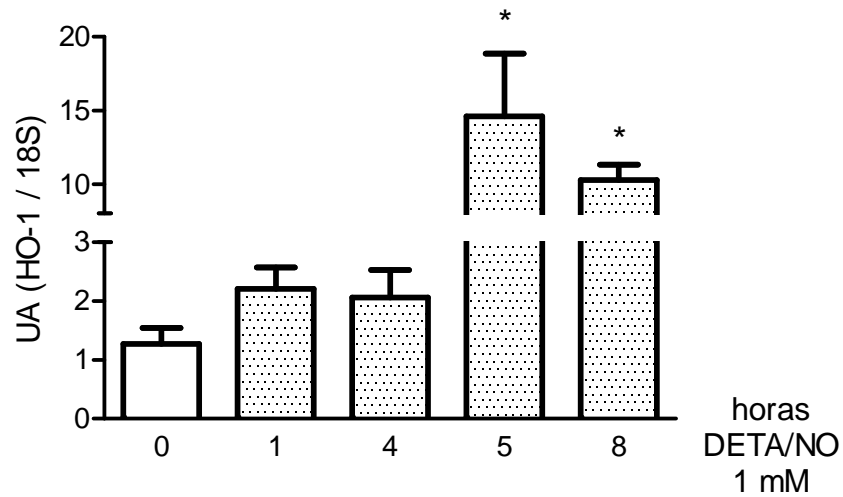


Figura 44: Efecto del DETA/NO sobre los niveles de ARNm de HO-1 en células Y1. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de DETA/NO durante 5 horas (A) o con DETA/NO 1 mM durante distintos tiempos (B). Finalizadas las incubaciones las células se trataron con TRizol, se obtuvo el ARN total y se realizó RT-PCR para el ARNm de HO-1 y para el ARNr 18S. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, *** $p < 0.001$, * $p < 0,05$ vs. 0 y ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$ vs. 250 μ M por el test de Tukey.

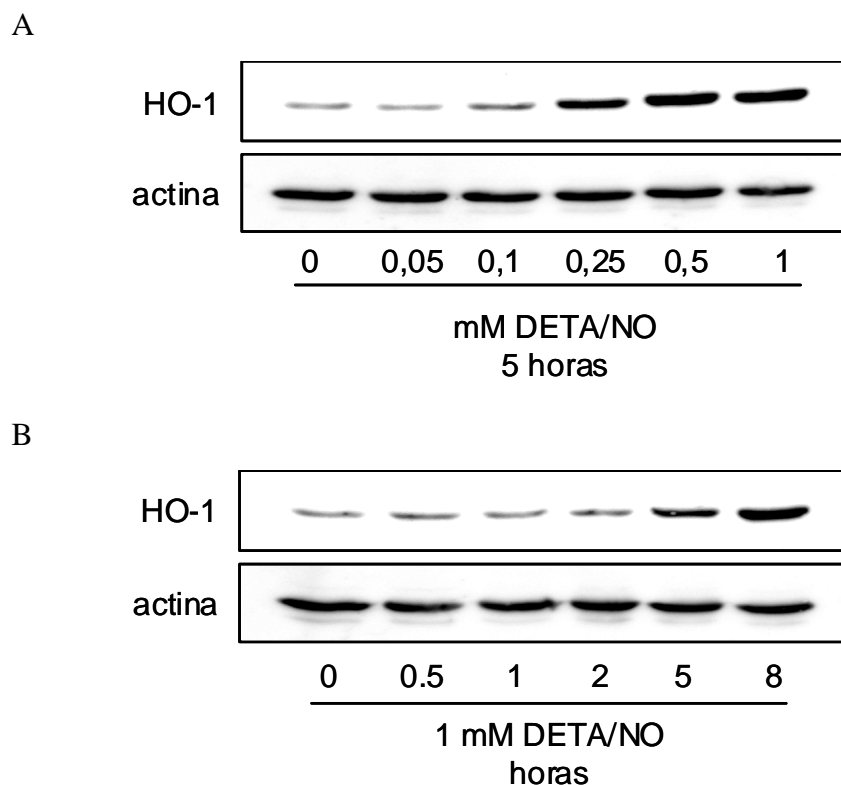


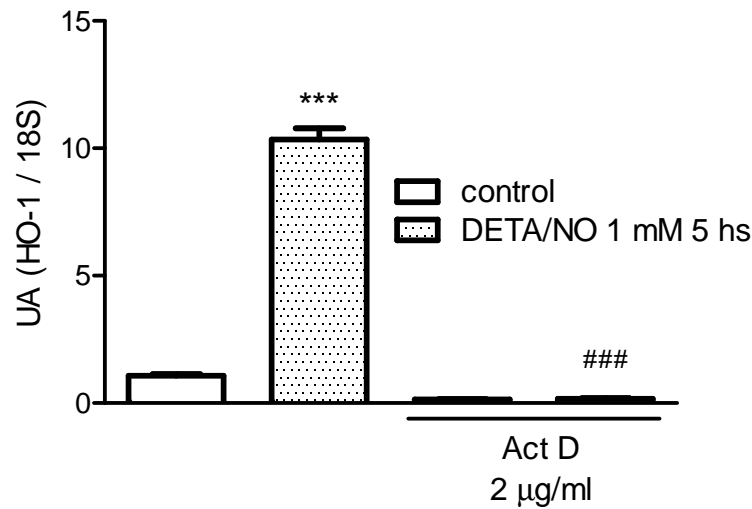
Figura 45: Efecto del DETA/NO sobre los niveles proteicos de HO-1 en células Y1. Las células se incubaron durante diferentes intervalos en presencia de DETA/NO 1 mM (A) o con concentraciones crecientes de DETA/NO durante 8 horas (B). Finalizadas las incubaciones se aislaron las proteínas y se analizaron por western blot para HO-1 y actina. Se muestran western blots representativos de 3 experimentos independientes.

6.2- Efecto del DETA/NO sobre la actividad del promotor de HO-1

Se estudió a continuación el mecanismo por el cual el NO incrementa los niveles de HO-1. En primer lugar se estudió el efecto del DETA/NO sobre la actividad de los plásmidos conteniendo los fragmentos del promotor -4045;+74 y -453;+74. El tratamiento con DETA/NO durante 8 o 24 horas no tuvo efecto sobre la actividad de ninguno de los plásmidos analizados (datos no mostrados).

Se analizó luego el efecto del bloqueo de la transcripción sobre el incremento en los niveles de ARNm y proteína de HO-1 por DETA/NO. En este grupo de experimentos las células fueron tratadas con actinomicina D durante 30 min y luego incubadas con DETA/NO 1 mM durante 5 horas. Se observó que la actinomicina D bloqueó el efecto del DETA/NO sobre los niveles de ARNm y proteína de HO-1 (Figura 46).

A



B

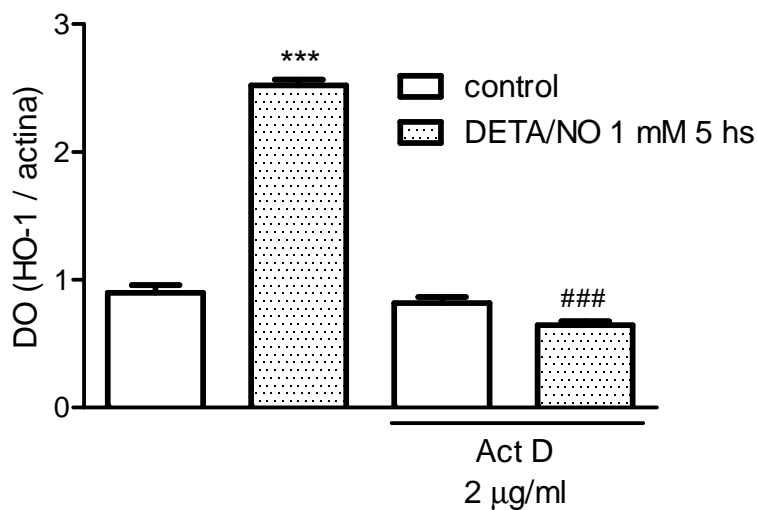


Figura 46: Efecto de la actinomicina D sobre los niveles de expresión de HO-1 por DETA/NO. Las células se incubaron durante 30 minutos en ausencia o presencia de actinomicina D y luego se continuó la incubación durante 5 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 1 mM. Finalizada la incubación las células se homogeneizaron con el reactivo de TRIzol y se extrajeron el ARN y las proteínas totales. A) Análisis por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de HO-1 normalizados con el ARNr 18 S, B) Western blot representativo mostrando HO-1/actina. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, *** p<0.001 vs. control, ### p<0.001 vs. DETA/NO por el test de Tukey.

A continuación se evaluó la estabilidad del mensajero de HO-1. Para esto, las células se trataron durante 5 horas con DETA/NO 1 mM. Luego se les agregó actinomicina D y se determinaron los niveles de ARNm de HO-1 por RT-PCR en tiempo real a distintos intervalos luego del agregado del inhibidor. Los resultados

indicaron que no existen cambios en la tasa de degradación del mensajero por el tratamiento con DETA/NO. Esto sugiere que la estabilidad del mensajero de HO-1 no es afectada por el tratamiento con NO, al menos en el período estudiado (Figura 47).

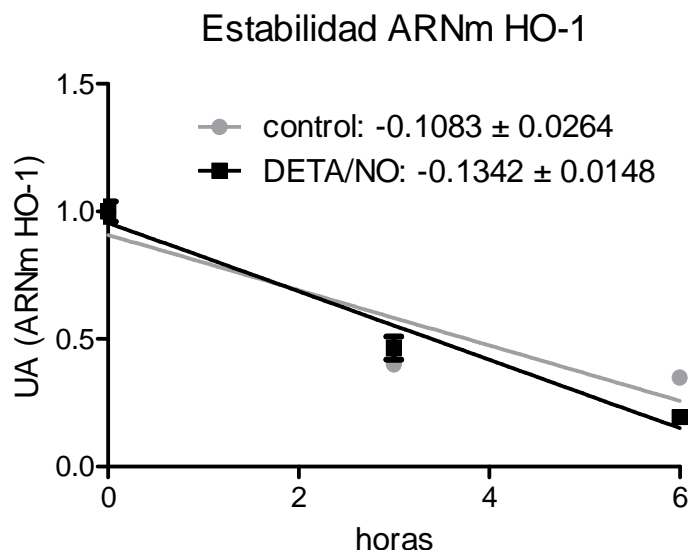


Figura 47: Estabilidad del mensajero de HO-1. Luego de una incubación de 5 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 1 mM se agregó actinomicina D 2 μ g/ml al medio de cultivo y se continuó la incubación por los tiempos indicados. La Figura muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de HO-1 en función del tiempo de incubación en ausencia o presencia de DETA-NO luego del agregado de actinomicina D. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=4. Las pendientes de ambas rectas no son significativamente diferentes, ANOVA de dos vías, $p=0,2166$.

6.3- Parámetros de estrés oxidativo

En esta serie de experimentos estudiamos parámetros de estrés oxidativo en células Y1 incubadas en presencia de DETA/NO. Se evaluaron los niveles de glutatión reducido (GSH), la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), los niveles de lipoperóxidos (como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) y la actividad de la enzima catalasa en células tratadas con DETA/NO 1 mM durante 5 horas. La Figura 48 muestra que el tratamiento con DETA/NO produjo una disminución significativa en la generación de ROS y en los niveles de TBARS y GSH mientras que la actividad de catalasa se mantuvo sin cambios.

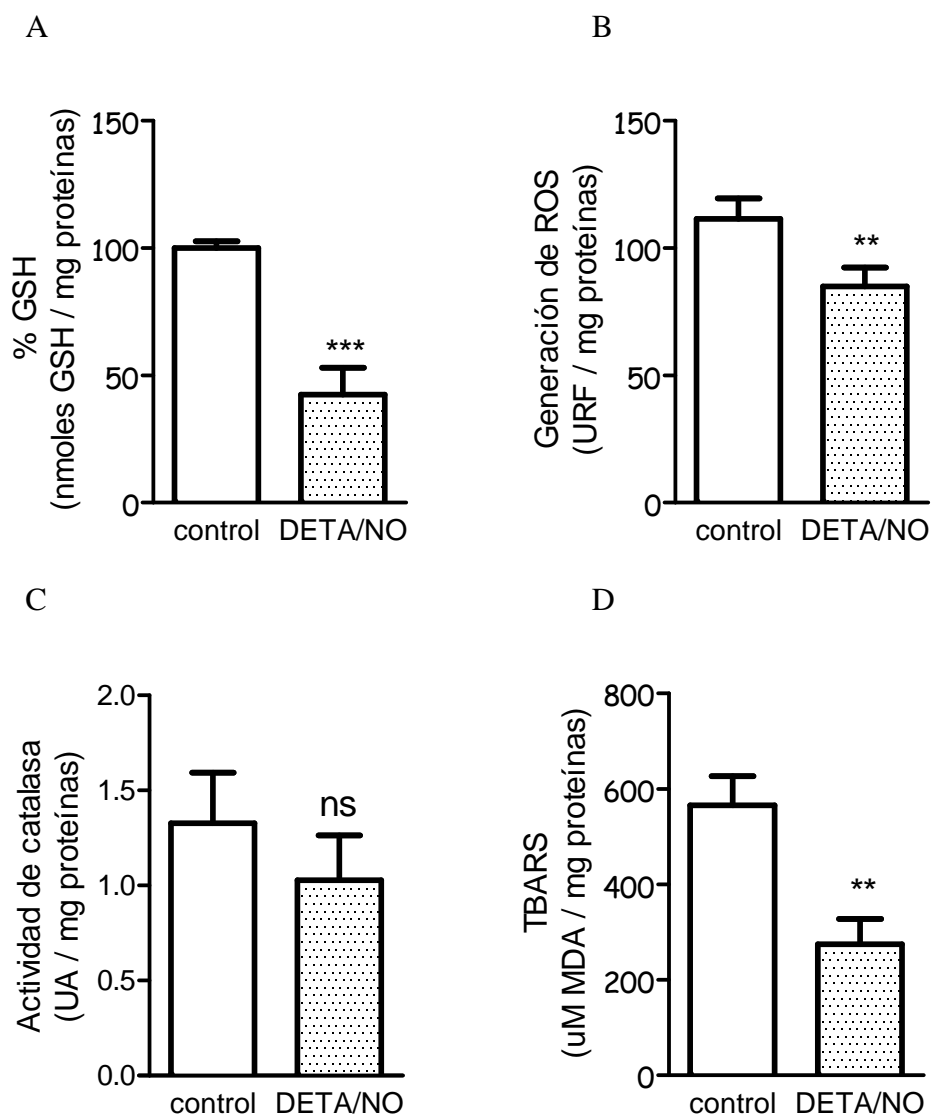


Figura 48: Efecto del DETA/NO sobre parámetros de estrés oxidativo. Las células fueron incubadas durante 5 horas con DETA/NO 1 mM y se determinó: A) Niveles de glutatión reducido; B) Generación de especies reactivas del oxígeno; C) Actividad de catalasa y, D) Niveles de lipoperóxidos, como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=4, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control por el test t.

A continuación se analizó la participación del estrés oxidativo en la inducción de HO-1 por DETA/NO. En estos experimentos se preincubaron las células con antioxidantes y se analizó el efecto del NO sobre los niveles de HO-1. Las células Y1 fueron incubadas en presencia de los antioxidantes alfa tocoferol (α -T 100 μ M), butilhidroxitolueno (BHT 25 μ M) y bilirrubina (Bi 1 μ M) 30 min antes de la incubación con DETA/NO 1 mM durante 5 horas. Ninguno de los antioxidantes utilizado tuvo efecto sobre la inducción de HO-1 por DETA/NO (Figura 49).

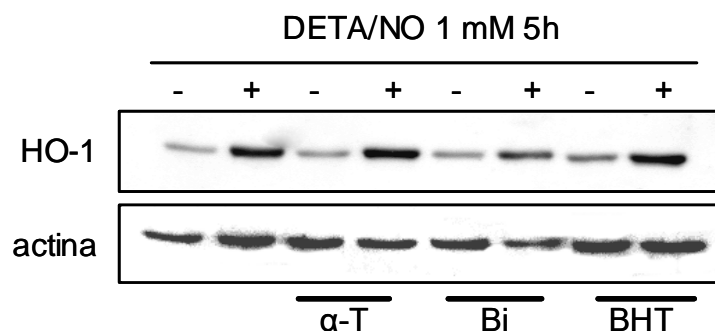


Figura 49: Efecto de antioxidantes sobre la inducción de HO-1 por DETA/NO. Las células fueron preincubadas con alfa tocoferol 100 μ M (α -T), bilirrubina 1 μ M (Bi) o butilhidroxitolueno 25 μ M (BHT) durante 30 min y luego tratadas durante 5 horas con DETA/NO 1 mM. Se utilizaron los homogenatos celulares para analizar los niveles de proteínas de HO-1 y actina por western blot. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

6.4- Participación del factor de transcripción Nrf2 en el mecanismo de acción del DETA/NO

Con el objeto de evaluar la participación del factor de transcripción Nrf2 en los efectos del dador de NO en las células Y1 se estudió, en primer lugar, la actividad del plásmido reportero Nrf2/LUC en células tratadas con DETA/NO 1 mM durante 24 horas. Los resultados indicaron que la actividad del plásmido reportero no fue afectada por el tratamiento con NO (Figura 50A). Se estudió también el efecto del NO sobre la actividad de transactivación de Nrf2. Con este fin, se utilizó un plásmido de expresión para una proteína quimera que contiene el dominio de transactivación de Nrf2 fusionado al dominio de unión al ADN de Gal4 (Nrf2:Gal4) y un plásmido reportero (pG5) que contiene sitios de unión a Gal4 río arriba de un promotor mínimo y del gen de luciferasa. Este sistema de plásmidos permite evaluar modificaciones en el dominio de transactivación del factor Nrf2 en forma independiente de su unión al ADN. Los resultados indicaron que el tratamiento con NO tampoco afectó el dominio de transactivación de Nrf2 ya que no se observaron efectos sobre la activación del plásmido reportero PG5 (Figura 50B).

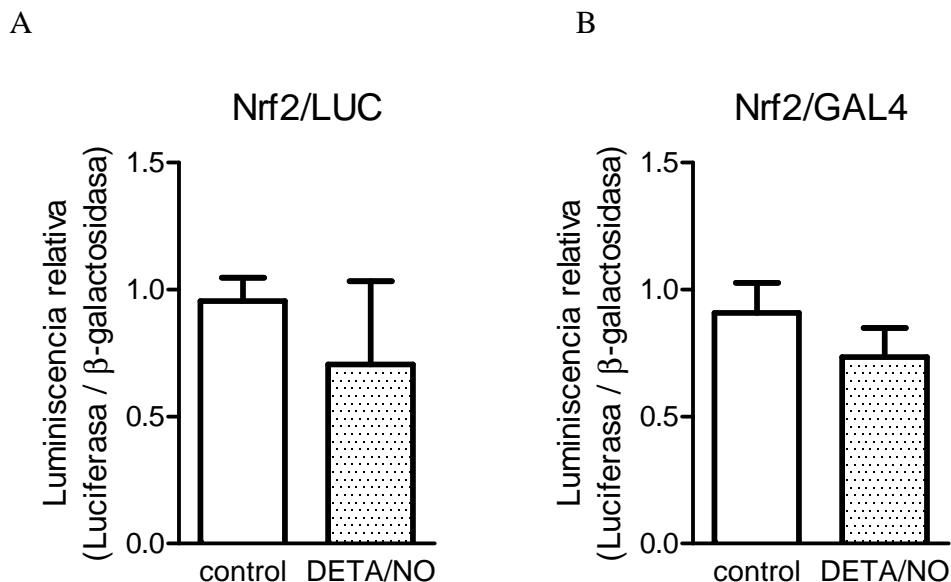


Figura 50: *Actividad de Nrf2 en células Y1 tratadas con DETA/NO.* Las células fueron transfectadas con los plásmidos Nrf2/LUC (A) o Nrf2:Gal4/P5 (B) e incubadas durante 24 horas con DETA/NO 1 mM. Se midió la actividad de luciferasa/ β -galactosidasa en homogenatos celulares. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos por el test t.

A continuación se evaluaron los niveles de expresión de Nrf2 mediante western blot (Figura 51). Las células fueron tratadas durante los tiempos indicados con DETA/NO 1 mM ó con CoCl_2 10 μM ó H_2O_2 400 μM durante 4 horas y luego se analizaron los niveles proteicos de Nrf2. Los resultados mostraron que el tratamiento con NO produce un aumento en los niveles de Nrf2 que se evidencia entre los 120 y 240 minutos. Como control positivo se muestra el efecto del tratamiento con CoCl_2 y H_2O_2 . El análisis de los niveles proteicos de Nrf2 en el citoplasma mostró un aumento a las 2 horas seguido de una disminución a las 4 y 6 horas. No se detectó la expresión de Nrf2 en los extractos nucleares (datos no mostrados).

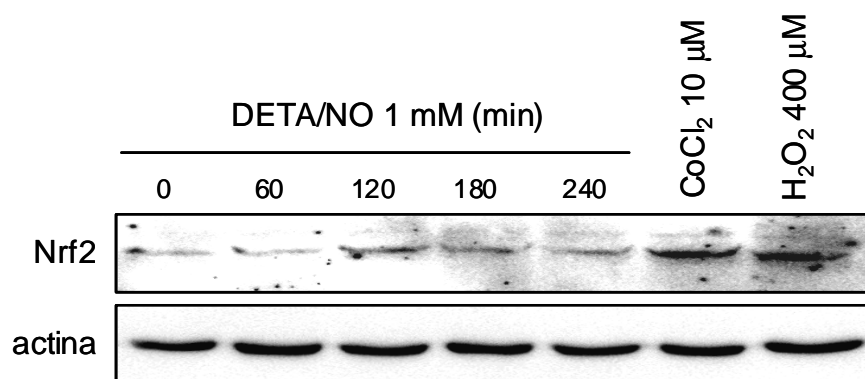
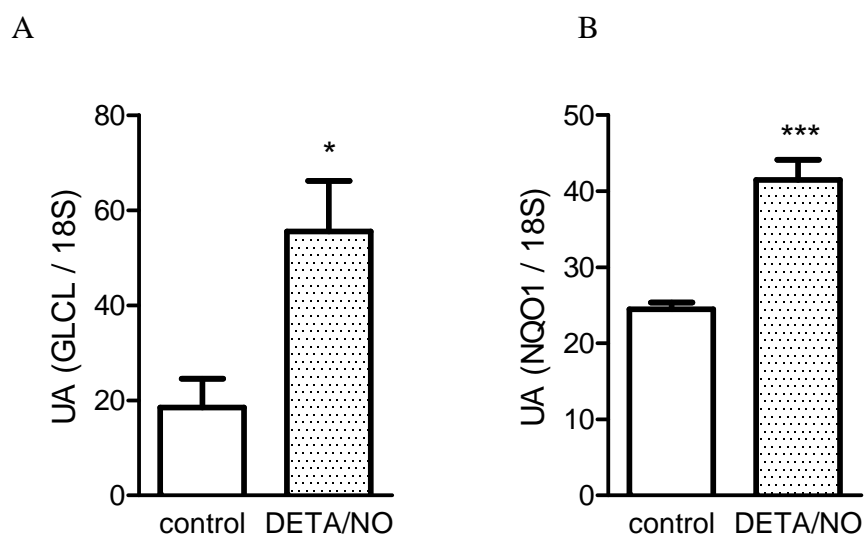


Figura 51: Niveles proteicos de Nrf2 en células Y1 tratadas con DETA/NO. Las células fueron incubadas durante 0, 60, 120, 180, 240 minutos con DETA/NO 1 mM o con CoCl₂ 10 μM o H₂O₂ 400 μM por 240 minutos. Se analizaron los niveles proteicos de Nrf2 y actina por SDS-PAGE.

6.5- Inducción de genes de detoxificación de fase II

Se analizó el efecto del NO en los niveles de ARNm de enzimas de fase II, que contienen sitios de unión a Nrf2 en sus promotores y que participan en el mecanismo de inducción en situaciones de estrés oxidativo o de citotoxicidad como la Glutamato-cisteína ligasa, subunidad regulatoria (GCLM) y catalítica (GCLC) y la NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1). Luego del tratamiento con DETA/NO 1 mM durante 5 horas se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de las tres enzimas analizadas (Figura 52).



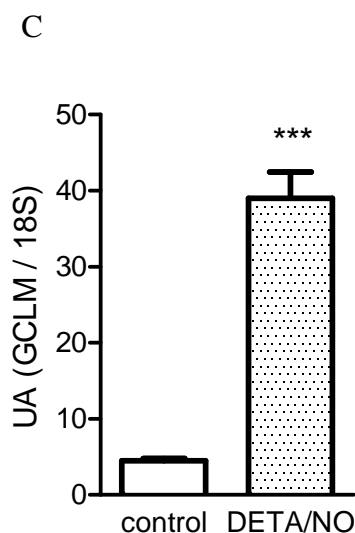
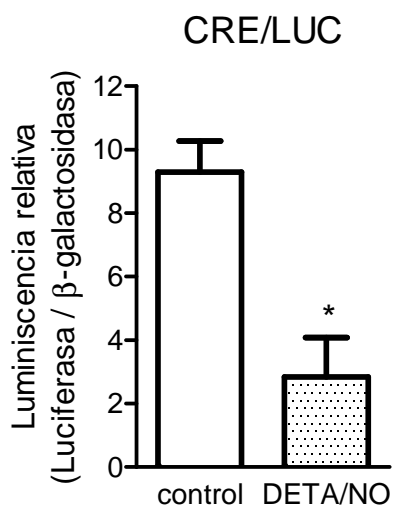


Figura 52: Efecto del DETA/NO sobre los niveles de ARNm de enzimas de fase II. Las células fueron incubadas con DETA/NO 1 mM durante 5 horas. Finalizado este período las células se trataron con TRIZOL, se obtuvo el ARN total y se realizaron RT-PCR en tiempo real para determinar los niveles de los ARNm de GLCL, NQO1 y GCLM y para el ARNr 18S. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, * p <0.05, *** p <0.001 vs. control por el test t de Student

6.6- Participación de los factores de transcripción CREB y NF κ B en el mecanismo de acción del NO

Se evaluó la actividad de los factores de transcripción CREB y NF κ B mediante el uso de plásmidos reporteros, en células Y1 tratadas con DETA/NO 1 mM durante 24 horas. En ambos casos el tratamiento provocó una inhibición significativa de la actividad de los plásmidos (Figura 53).

A



B

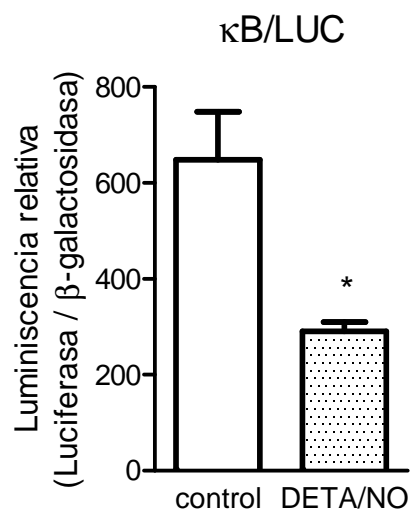
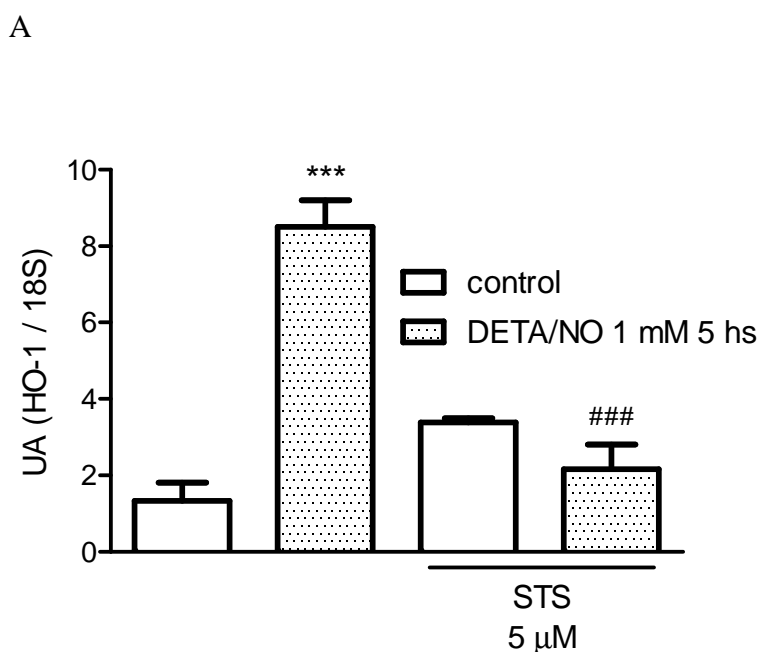


Figura 53: Actividad de CREB y de NFKB en células Y1 tratadas con DETA/NO. Las células fueron transfectadas con los plásmidos CRE/LUC (A) o κ B/LUC (B) como se describe en Materiales y Métodos e incubadas durante 24 horas con DETA/NO 1 mM. Se midió la actividad de luciferasa/ β -galactosidasa en homogenatos celulares. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, * p <0.05 vs. control por el test t.

6.7- Vías de transducción de señales involucradas en la inducción de HO-1 por DETA/NO

6.71- Vía de PKC

Se analizó la participación de la actividad de PKC en la inducción de HO-1 por NO utilizándose los inhibidores Ro320432, Ro31-8220, queleritrina y staurosporina. En estos experimentos las células Y1 fueron preincubadas durante 30 minutos con los inhibidores y luego incubadas durante 5 horas con DETA/NO 1 mM, determinándose los niveles de ARNm y de proteínas de HO-1. Los resultados indicaron que la staurosporina previno completamente la inducción de HO-1 por NO tanto a nivel del ARNm como de proteínas (Figura 54), mientras que el Ro320432 bloqueó parcialmente el aumento en los niveles proteicos de HO-1 (Figura 55). Resultados similares se obtuvieron utilizando queleritrina, mientras que el Ro318220 no tuvo efecto (datos no mostrados).



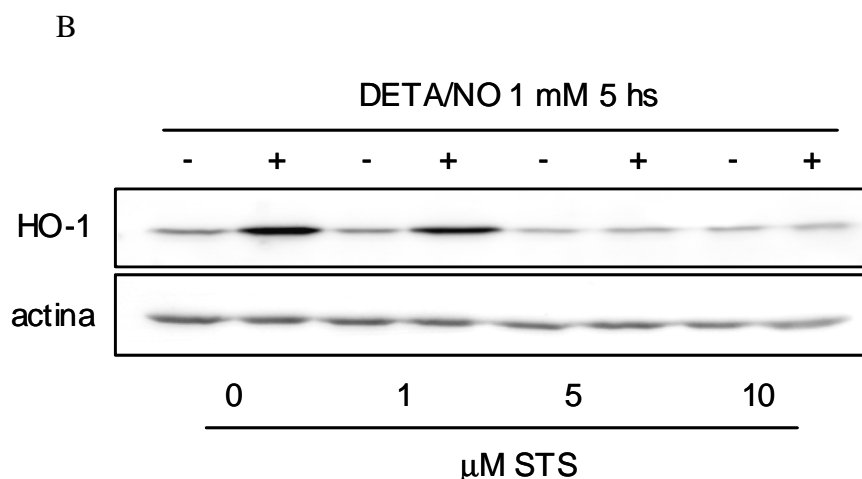


Figura 54: Inducción de HO-1 por DETA/NO en presencia de inhibidores de PKC. Las células fueron preincubadas con staurosporina (STS) a las dosis indicadas durante 30 min y luego tratadas durante 5 horas con DETA/NO 1 mM. Se analizaron los niveles de ARNm de HO-1 y ARNr 18S por RT-PCR en tiempo real (A) y las proteínas por western blot para HO-1 y actina (B). Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, ***p<0.001 vs. control, ###p<0.001 vs. DETA/NO por el test de Tukey.

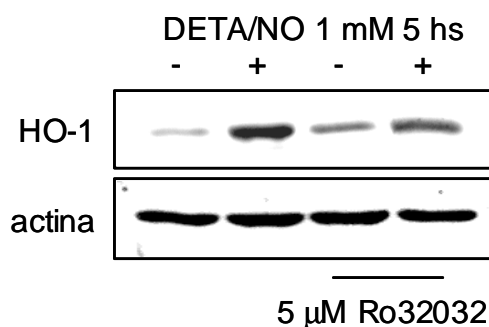


Figura 55: Inducción de HO-1 por DETA/NO en presencia de inhibidores de PKC. Las células fueron preincubadas con Ro320432 5 µM durante 30 min y luego tratadas durante 5 horas con DETA/NO 1 mM. Se utilizaron los homogenatos para analizar las proteínas de HO-1 y actina, por western blot. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

6.72- Vía del Ca^{2+}

Para analizar la participación de alteraciones en el flujo de Ca^{2+} en la inducción de HO-1 por NO, se preincubaron las células Y1 con los quelantes de cationes divalentes EGTA (extracelular) y BAPTA-AM (intracelular) 30 minutos antes de comenzar el tratamiento con DETA/NO 1 mM durante 5 horas. No se observaron diferencias en el efecto del DETA/NO sobre los niveles proteicos de HO-1 (datos no mostrados).

6.73- Cascadas de MAPKs

Se estudió la participación de las vías de MAPKs en el mecanismo de inducción del NO, utilizando los inhibidores específicos para ERK1/2 (PD98059 10 μ M), JNK (SP600125 5 μ M) y p38 (SB203580 5 μ M). Se analizó por western blot la inducción de HO-1 por DETA/NO en presencia de los inhibidores mencionados. Los resultados indicaron que los inhibidores utilizados no tienen efecto sobre la inducción de HO-1 por DETA/NO (Figura 56).

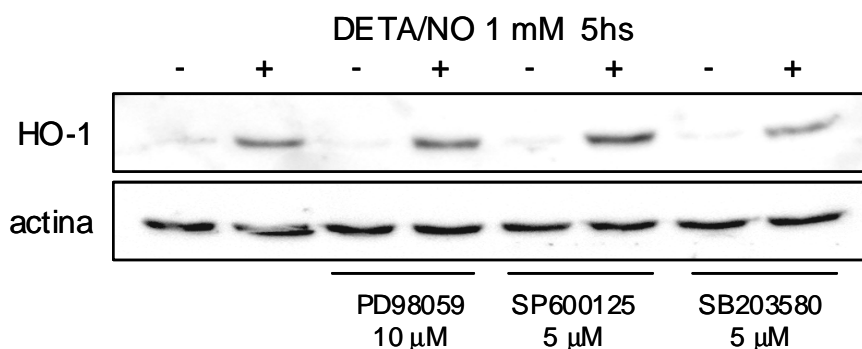


Figura 56: Inducción de HO-1 por DETA/NO en presencia de inhibidores de MAPKs. Las células fueron preincubadas con SB203058 5 μ M, SP600125 5 μ M o PD98059 25 μ M durante 30 min. Luego se agregó DETA/NO 1 mM y se prosiguió la incubación durante 5 horas. Se utilizaron los homogenatos para analizar las proteínas por western blot. Se muestra un western blot representativo de tres experimentos independientes.

6.74- Vía de PI3K

En estos experimentos se inhibió la vía de PI3K con el inhibidor específico wortmanina (5 μ M) y se analizó la inducción de HO-1 por DETA/NO 1 mM durante 5 horas. Los resultados mostraron que si bien la wortmanina disminuyó los niveles basales de HO-1 no afectó la inducción de HO-1 por NO (datos no mostrados).

6.75- Vía del GMPc

Uno de los blancos clásicos de la acción del NO es la actividad de la guanilato ciclasa soluble, cuya activación genera un incremento en los niveles de GMPc. Con el fin de evaluar la participación de esta actividad en el mecanismo de inducción de HO-1 por NO se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar se inhibió la actividad de la guanilato ciclasa soluble con el inhibidor específico ODQ y se analizó

por western blot la inducción de HO-1 por DETA/NO 1 mM durante 24 horas. Se observó una inhibición significativa de la inducción de la proteína HO-1 cuando las células se incubaron con ODQ 10 μ M (Figura 57).

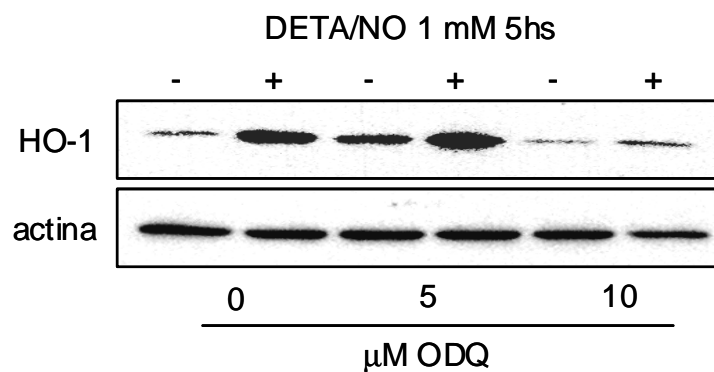
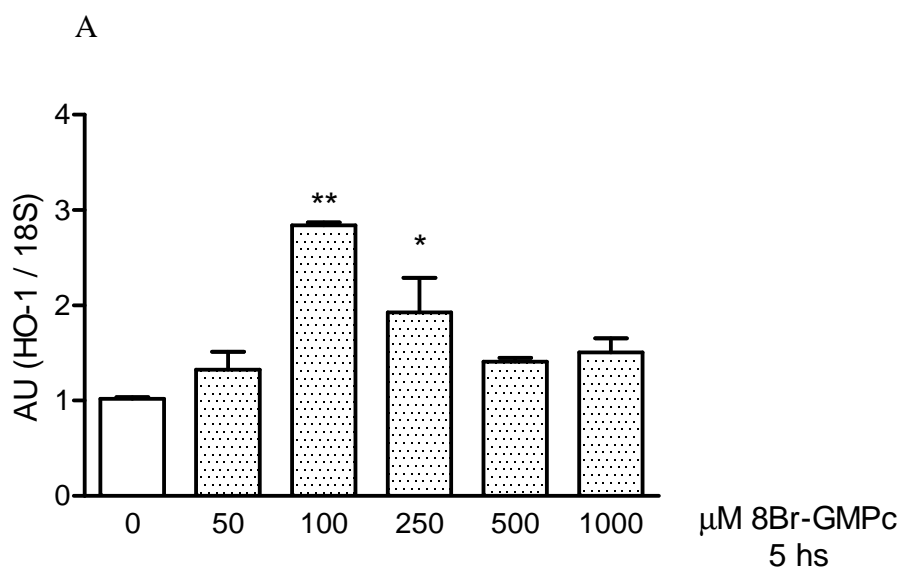


Figura 57: Inducción de HO-1 por DETA/NO en presencia de inhibidor de la GCs. Las células fueron preincubadas con ODQ en las dosis indicadas durante 30 min y luego incubadas en presencia de DETA/NO 1 mM por 5 horas. La Figura muestra un western blot representativo de HO-1 y actina.

A continuación se analizó el efecto del 8Br-GMPc sobre los niveles de HO-1. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de ARNm y proteínas de HO-1 por el tratamiento con un análogo permeable de GMPc (Figura 58).



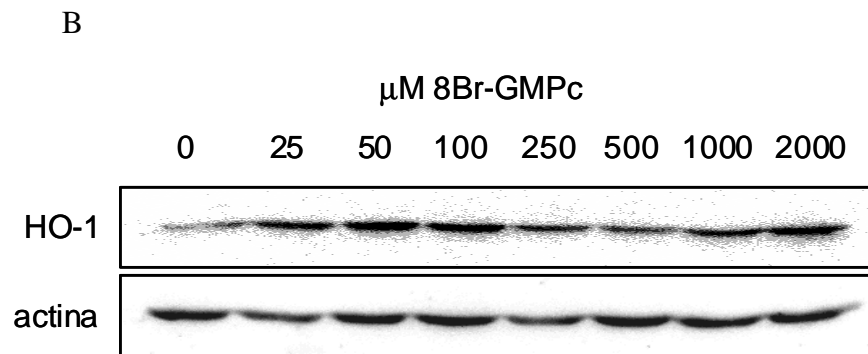


Figura 58: Inducción de HO-1 por 8Br-GMPc. Las células fueron incubadas con 8-BrGMPc en las dosis indicadas durante 5 horas y luego se homogenizaron en TRiZol. Los niveles de ARNm de HO-1 y ARNr 18S se analizaron por RT-PCR en tiempo real. Los datos se presentan como media \pm SEM, N=3, **p<0.01, *p<0.05 vs. control por el test de Dunnett (A). En (B) se muestra el análisis por western blot de los niveles de proteínas de HO-1 y actina. Se indica un experimento representativo.

DISCUSIÓN

7- Discusión

7.1- Participación de HO-1 en la regulación de la esteroidogénesis adrenal

En la actualidad se considera que la actividad de HO-1 es clave en la fisiología, no solo por su actividad como enzima antioxidante sino también por los múltiples procesos en los que está involucrada. Entre ellos podemos citar la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, la inhibición de la secreción de moléculas pro-inflamatorias en células o tejidos dañados, los mecanismos de defensa frente a infecciones microbianas, la regulación de la esteroidogénesis, la diferenciación a fenotipo maligno de células tumorales, la regulación de la actividad de las sinapsis nerviosas, y la modulación de la actividad de hemoproteínas, como los citocromos, entre otras [67, 91-93].

En trabajos previos en nuestro laboratorio detectamos la expresión de HO-1 y HO-2 tanto en la línea celular adrenocortical Y1 como en la zona *fasciculata* de corteza adrenal de rata. Asimismo demostramos la inducción de HO-1 por ACTH y por LPS en ambos sistemas [1, 2].

Como se mencionó previamente, se ha adjudicado a la actividad de HO y, en particular, a la inducción de HO-1, una función citoprotectora frente el estrés oxidativo en diferentes sistemas celulares [94, 95]. Resultados de nuestro laboratorio indican que la inducción de HO-1 cumple también una función citoprotectora en las células Y1, ya que se asocia con una disminución del daño celular en respuesta a la injuria oxidativa [1].

Con respecto a su rol como modulador de la esteroidogénesis adrenal, los resultados presentados en este trabajo de tesis, utilizando un enfoque molecular, confirman los obtenidos previamente con inhibidores farmacológicos [67], ya que el bloqueo de la expresión de HO-1 incrementa la esteroidogénesis, mientras que su sobreexpresión la disminuye significativamente. Resultados similares fueron obtenidos por Piotrkowski et al quienes demostraron que la inducción de HO-1 por hemina provoca la inhibición de la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG o dibutiril-AMPC en la línea de células de Leydig MA-10 [64].

¿Cuál es el mecanismo mediante el cuál la actividad de HO-1 modula la producción de esteroides? Al respecto podemos postular las siguientes hipótesis: 1) un aumento en la actividad de HO disminuiría los niveles de hemo con la consecuente

reducción de la actividad de las enzimas con citocromo P450, como las que participan de la biosíntesis de esteroides. 2) el CO, producto de la actividad de HO-1, podría interactuar con los grupos hemo de las enzimas esteroidogénicas inhibiendo su actividad [64, 96]. En este sentido se ha demostrado la inhibición del citocromo c por CO en células Raw264.7 [96, 97], y 3) los productos de la actividad de HO podrían alterar la transcripción de genes involucrados en la esteroidogénesis. Como ejemplo se puede citar la inhibición por bilirrubina de la expresión de iNOS estimulada por LPS en hepatocitos de rata [98] y la inducción por CO de genes implicados en la inflamación vía la activación de MAPKs y GCs [62].

7.2- Inducción de HO-1 por ACTH

Como se mencionó anteriormente, dados sus efectos pleiotrópicos, se considera que el ACTH es el principal regulador de la fisiología de la zona *fasciculata* de la corteza adrenal. Entre otros, se ha demostrado que el ACTH tiene efectos sobre la proliferación celular, aumenta el tamaño y la complejidad funcional de las organelas, y el tamaño y el número de las células adrenales y también estimula la esteroidogénesis tanto en forma aguda, incrementando el aporte de sustrato para la reacción catalizada por la CYP11A1 mitocondrial, primer paso enzimático de la vía [99, 100], como en forma crónica mediante efectos a nivel génico [101, 102].

El mecanismo clásico de acción del ACTH involucra la unión a su receptor de siete dominios transmembrana, y mediante la activación de la proteína Gs y la adenilato ciclasa, el incremento en los niveles del segundo mensajero AMPc y la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Por este mecanismo se induce en forma aguda la síntesis y secreción de hormonas esteroideas [103]. A su vez, una respuesta más tardía implica la activación de genes involucrados en la esteroidogénesis, por ejemplo StAR [104] y CYP11A [103].

La inducción de HO-1 por ACTH en células adrenales murinas de la línea Y1 ha sido descrita previamente por nuestro grupo de trabajo postulándose un efecto del ACTH a nivel de la transcripción del gen [1]. Dos líneas de evidencia experimental demostraron la participación de la vía AMPc/PKA en el mecanismo de acción de ACTH: por un lado, análogos de AMPc reprodujeron el efecto de la hormona y por el otro, un inhibidor de PKA, H89, lo bloqueó [1].

Los resultados presentados en esta tesis respaldan la hipótesis de que el tratamiento de las células Y1 con ACTH (y con 8Br-AMPC) incrementa la transcripción del gen de HO-1 ya que plásmidos reporteros cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor del gen de HO-1 murino fueron activados por ambos estímulos. Otros estudios han demostrado la participación de la vía de AMPc en la inducción de HO-1 en distintos tipos celulares. En este sentido Durante *et al* demostraron que el AMPc provoca la inducción de la expresión de HO-1 y estimula la formación de CO en células de musculo liso [72] y el grupo de Muller-Eberhard demostró su participación en la inducción de la expresión de HO-1 en cultivos primarios de hepatocitos de rata [71].

La participación de la quinasa PKA en este mecanismo fue confirmada evaluando la activación del promotor de HO-1 por ACTH en presencia del inhibidor H89. Estos resultados nos llevaron a concluir que el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH involucra la activación del promotor de HO-1 mediante la activación de la vía de AMPc/PKA.

Se determinó también que una zona del promotor de HO-1 murino, de 400 pb aledaña al inicio de la transcripción, es necesaria para la respuesta a ACTH/AMPc/PKA. Análisis putativos de esta región mostraron elementos de respuesta para diversos factores de transcripción, entre ellos, CREB, AP-1, HIF y E-BOX. Nuestro interés se enfocó en los factores CREB y AP-1 ya que los mismos han sido relacionados con la inducción de HO-1 [105]. En particular, Mattos *et al* han descrito que el ACTH y análogos del AMPc estimulan la fosforilación de CREB en células Y1 [106]. A su vez, la vía AMPc/PKA/CREB a sido relacionada con la inducción de HO-1 en otros modelos. Por ejemplo, Lam *et al* demostraron que el tratamiento de macrófagos con ACTH provoca la inducción de HO-1 a través del receptor MC3-R y un aumento en los niveles de AMPc, sugiriendo la participación de la vía PKA/CREB [107]. Por otro lado, Oeseburg *et al* demostraron que la inducción de HO-1 por el péptidos similar a glucagón (GLP-1) en células endoteliales vasculares depende de la activación de la vía PKA/CREB [108].

Los sitios consenso encontrados para el factor CREB y AP-1 en el promotor murino de HO-1 se encuentran en la zona más próxima al inicio de la transcripción (-153 y -44). Este hallazgo es consistente con el mecanismo de inducción de genes por CREB, propuesto por el grupo de Montminy, que demuestra mediante un análisis “*genome-wide*” del genoma de distintos organismos, que estos sitios se encuentran

dentro de las 300 pb más cercanas a los sitios de iniciación de la transcripción [109]. A su vez, la cercanía entre los sitios de CREB y AP-1 podría asociarse con la formación de complejos de transcripción por los dos factores en forma simultánea o alternándose, para activar o inhibir la transcripción. A modo de ejemplo, por un lado se ha descrito la existencia de complejos proteicos formados por CREB/AP-1 capaces de activar el promotor del gen de colágeno en osteoblastos [110] y por otro, Manna y Stocco demostraron la existencia de un *cross-talk* entre ambos factores en la regulación del promotor de StAR por AMPc en las células de Leydig de la línea MA10, donde CREB activaría el promotor reclutando el cofactor CBP, mientras que AP-1, por competencia por el sitio consenso en el ADN, lo inhibiría [15].

Dado que diversos autores han demostrado la activación del factor de transcripción CREB en la vía de transducción de AMPc/PKA [109, 111, 112] decidimos analizar su participación en la inducción del promotor de HO-1 en células Y1. Nos propusimos entonces investigar si 1) el tratamiento con ACTH produce la activación de CREB y 2) si el factor CREB activado induce la transcripción del gen de HO-1.

Experimentos realizados con plásmidos reporteros (CRE/LUC) demostraron la activación de CREB por 8Br-AMPc. En forma semejante, Spiga *et al* demostraron un aumento en los niveles de CREB fosforilado y de su coactivador TORC en el núcleo de células adrenales provenientes de ratas inyectadas con ACTH [113]. Por otra parte, nuestros resultados también demostraron que la sobreexpresión de CREB aumentó la actividad promotora de los fragmentos -4045, +74 y -353; +74, así como los niveles de expresión de HO-1 endógena.

Es sabido que la fosforilación de CREB (en serina 133) mediada por la actividad de PKA participa en el mecanismo de acción de ACTH a nivel genómico. Sin embargo, el hecho de que el 8Br-AMPc no incremente significativamente el efecto de la sobreexpresión de CREB sobre la actividad del promotor de HO-1 parecería indicar que la sobreexpresión de CREB es capaz de inducir la expresión de HO-1. Sin embargo, se ha demostrado que diversas proteínas quinasas como Akt/PKB, PKC, CAM KII y P90RSK, entre otras, son capaces de activar CREB por fosforilación [114-117], por lo que una posible explicación para estos resultados podría ser la existencia de una actividad de quinasa basal en las células Y1, en nuestras condiciones experimentales, responsable del incremento en la fosforilación de CREB. Evidencias en este sentido han sido aportadas por el grupo de Armelin que demostraron que la línea celular Y1 presenta una actividad constitutiva de Akt/PKB [118, 119]. De hecho, los experimentos

con un dominante negativo de CREB, que no puede ser activado por fosforilación, confirman la participación de CREB en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH/AMPC, la localización del sitio de reconocimiento de CREB en el fragmento pequeño del promotor y la necesidad de fosforilación de este factor. Kronte *et al* demostraron de esta forma la participación de CREB en la inducción de HO-1 por fosfolípidos oxidados en células endoteliales umbilicales humanas [73].

Resultados previos de nuestro laboratorio [1] en conjunto con los presentados en esta tesis demuestran que la incubación de células Y1 con ACTH genera estrés oxidativo. El aumento en la producción de ROS podría ser consecuencia del incremento en la actividad de las enzimas citocromos P450 mitocondriales que participan del proceso esteroideogénico. En este sentido se ha postulado que la fuga de electrones del sistema mitocondrial P450c11 es la fuente principal de generación de radical superóxido en las células adrenales [120, 121].

En nuestro sistema, las células incubadas con ACTH muestran una disminución en la generación de ROS cuando se exponen al H₂O₂. Este efecto podría, al menos en parte, ser consecuencia de la inducción de HO-1, que produce biliverdina y su derivado bilirrubina, ambas moléculas con reconocida actividad como moléculas antioxidantes con capacidad de captar radicales libres y disminuir el estrés oxidativo. Como se planteó anteriormente el tratamiento con ACTH genera estrés oxidativo y también induce sistemas antioxidantes de citoprotección que evitan daños mayores.

Se ha demostrado en numerosos sistemas experimentales que el mecanismo de inducción de HO-1 por estrés oxidativo involucra la activación de los factores de transcripción Nrf2 (mediante su estabilización y movilización al núcleo), y/o NFκB, (mediante su fosforilación y desplazamiento al núcleo) [122-125]. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que estos factores no participan en la inducción de HO-1 por ACTH en las células Y1. En conclusión, si bien la incubación con ACTH genera estrés oxidativo y promueve la inducción de HO-1 en las células Y1, el mecanismo de inducción utilizado no parece involucrar a los factores que clásicamente se activan por desbalance redox.

Otro factor de transcripción que podría estar implicado en la inducción de HO-1 por estrés oxidativo es AP-1. Este factor de transcripción puede ser activado por una amplia variedad de estímulos (MAPKs, citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés, etc.) [126]. En particular, se ha descrito que ACTH induce la activación de la

vía ERK1/2 en las células Y1 [127] y que el bloqueo de esta vía, con el inhibidor específico PD98059, evita la inducción de c-fos en células Y1 tratadas con ACTH [16].

En las células Y1, el tratamiento con ACTH/AMPC provocó la activación de AP-1, medida con un plásmido reportero. Este resultado es consistente con lo publicado por Mukai *et al*, quienes demostraron que el tratamiento con ACTH o un análogo de AMPC provoca aumento en los niveles de ARNm de los genes fos y jun (que forman el heterodímero AP-1) en la línea celular Y1 [128]. Según estos autores, la estimulación de la actividad de AP-1 se observa a partir de la inducción de c-fos y c-jun a partir de las 5 horas de tratamiento. Resta por analizarse la participación de AP-1 en la inducción de HO-1 por ACTH. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que HO-1 también se induce luego de 5 horas de tratamiento por lo que es posible que estos genes se activen simultáneamente por un factor común, como por ejemplo, CREB. En este sentido, numerosas referencias bibliográficas describen la inducción de las subunidades de AP-1 (fos y jun) a través de la unión del factor CREB a sus promotores [129].

Los experimentos realizados con inhibidores de MAPKs indican que estas vías no participarían en la inducción de HO-1 por ACTH. Notablemente, los resultados obtenidos con el inhibidor de la vía de ERK1/2 sugieren un efecto inhibitorio de esta vía sobre la actividad “basal” del promotor de HO-1 en las células Y1 (ver también los resultados de la sección de LPS). En este sentido, Le y Schimmer han demostrado que la vía de ERK1/2 está activa en células Y1 crecidas en medio conteniendo 15% de suero animal [127].

En suma los resultados presentados permitirían descartar la participación de las MAPKs y de AP-1 en la inducción de HO-1 por ACTH/AMPC.

La línea celular Y1 ha sido caracterizada por la activación constitutiva del protooncogen c-Ki-Ras [130]. Como consecuencia estas células exhiben una mayor actividad de PI3K y de su quinasa efectora Akt/PKB [118]. La activación de PI3K y de la proteína quinasa Akt/PKB por fosforilación (Ser473 y Thr308), están involucradas en los efectos mitogénicos y antiapoptóticos desencadenados por factores de crecimiento [131]. En este sentido, el grupo de Armelin ha descrito que ACTH induce la defosforilación (inactivación) de esta quinasa en células Y1 creciendo en forma exponencial (10% suero fetal bovino) o arrestadas en G0/G1 (medio libre de suero) [118]. El efecto observado sobre Akt/PKB es de cinética rápida (se observa a los 2 minutos), y depende exclusivamente de la vía adenilato ciclasa/AMPC/PKA sin cambios en los niveles de c-Ki-Ras-GTP. Notablemente, en nuestras condiciones experimentales

el tratamiento con un análogo de AMPc provocó un aumento transitorio en los niveles de fosforilación de Akt/PKB (con un pico a las 2 horas). Por otra parte, la inhibición de la vía de Akt/PKB previno parcialmente el efecto estimulador del 8Br-AMPc sobre la actividad de CREB, la activación del promotor de HO-1 (fragmento -353;+74) y el incremento en los niveles de ARNm de HO-1. Estos resultados sugieren la participación de la vía PI3K-Akt/PKB en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH/AMPc. Más aún, el efecto observado sobre la activación de CREB sugiere la existencia de un *cross-talk* entre las vías de Akt/PKB y de AMPc/PKA/CREB. Esta hipótesis ha sido demostrada en otros sistemas experimentales. Por ejemplo, Hayakawa *et al* estudiaron la activación del promotor de prolactina por el péptido liberador de prolactina y por insulina en células tumorales de hipófisis de rata, y demostraron que este mecanismo depende de la activación del factor CREB por la vía de PI3K-Akt/PKB [132]. Resultados similares fueron obtenidos al analizar la expresión de Bcl-2 en células PC12 estimuladas con IGF-1 [133]. Por otro lado, el AMPc también activa a EPAC (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina), lo que produce la activación de Ras y de Akt/PKB [134]. En la corteza adrenal nuevas evidencias han sugerido un rol de las proteínas EPAC en los cambios morfológicos inducidos por ACTH. En este sentido, Aumo *et al* demostraron la expresión de EPAC2B en las líneas celulares adrenal murina Y1 y humana H295R, y postularon su rol como mediadora de los efectos del AMPc sobre la integridad del citoesqueleto y la migración celular [135]. Resta analizar la relación entre la activación de las proteínas EPAC y la inducción de HO-1 por ACTH/AMPc en células adrenales.

En forma adicional se ha demostrado que HO-1 puede ser fosforilada por Akt/PKB en la serina 188, y que esta fosforilación provoca un aumento en su actividad enzimática y facilita su interacción con la NADPH citocromo P450 reductasa y la enzima biliverdina reductasa, ambas implicadas en la degradación del hemo [136]. En este sentido, la activación de AKT/PKB podría no solo intervenir en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH sino también participar de un mecanismo de modificación post-traducciona. Estos posibles efectos sobre la actividad de HO-1 aún no han sido analizados en las células Y1.

En resumen, los resultados presentados permiten concluir que el tratamiento de células Y1 con ACTH: 1) provoca la activación de la vía AMPc/PKA lo que lleva a la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB que posiblemente interactúe con sitios del promotor de HO-1 ubicados en una región acotada entre -353 y +74 del

inicio de la transcripción, 2) produce un desbalance redox que genera estrés oxidativo, que podría actuar en forma complementaria en la inducción de HO-1. No obstante, los resultados obtenidos permiten descartar la participación de los factores dependientes de estrés oxidativo, Nrf2 y NFκB en este mecanismo, 3) produce la activación del factor AP-1, aunque es poco probable su participación en la inducción de HO-1, por el marco temporal de inducción y por la falta de efecto de los inhibidores de MAPKs y, finalmente 4) induce la activación de la vía Akt/PKB que participa en el mecanismo de inducción de HO-1 por ACTH/AMPC posiblemente mediante la activación de CREB .

7.3- Inducción de HO-1 por LPS

El LPS induce un amplio espectro de efectos biológicos que han sido asociados a la infección por bacterias Gram negativas. Como ejemplo de la interacción entre los sistemas inmune y endócrino se ha demostrado que la administración *in vivo* de LPS provoca la estimulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) [137, 138] y que los glucocorticoides ejercen efectos inhibitorios en la respuesta inmune mediada por las células T y B y por la actividad de los fagocitos [139].

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición a LPS tiene un efecto directo sobre la producción de esteroides a nivel adrenal incrementando los niveles de glucocorticoides tanto en cultivos primarios de células de corteza adrenal de rata como en la línea celular Y1. También se detectó en este tejido la expresión de las proteínas TLR4, CD14, MD-2 y NFκB, todas moléculas involucradas en la transducción de señales inducida por LPS [90].

Se considera que la inducción de HO-1 y los productos del catabolismo del hemo forman parte de la respuesta inflamatoria inducida por LPS [140, 141]. En este sentido, se ha demostrado que el CO en bajas dosis media los efectos anti inflamatorios de HO-1 inhibiendo diferencial y selectivamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , MIP-1 β , e incrementando la de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, inducidas por LPS. Este efecto sería mediado por la activación de la vía de las MAPKs [62].

En particular, nuestro grupo de trabajo había demostrado previamente que el tratamiento *in vivo* con LPS resulta en un aumento en los niveles de expresión de HO-1 en corteza adrenal [2].

Los resultados aquí presentados confirman los efectos directos del LPS a nivel adrenal ya que la exposición de las células Y1 al LPS provoca un incremento en los niveles proteicos de HO-1. Asimismo los resultados obtenidos en cuanto al efecto estimulador del LPS sobre el promotor murino de HO-1 permiten sugerir que el LPS incrementa la transcripción del gen de HO-1 en las células Y1. Resta por confirmar esta hipótesis con experimentos que evalúen la transcripción/estabilidad del ARNm del gen endógeno.

Mediante el análisis de distintos fragmentos del promotor se logró localizar una zona del promotor de HO-1 murino entre -4045 y -2700 pb del sitio de inicio de la transcripción, en donde se encuentran los sitios de unión a los elementos responsables de la inducción por LPS. El análisis *in silico* de esta zona permitió identificar sitios para factores de transcripción como Nrf2, AP-1, CREB, IRF-3 y NFκB entre otros. Este último se reconoce como el principal factor activado por LPS en muchos sistemas celulares [20].

El factor de transcripción NFκB pertenece a la vía clásica de acción del LPS [142]. Su activación es necesaria para la inducción de genes implicados en la respuesta inmune como por ejemplo iNOS, COX-2, IL-1beta y TNF-alfa [143], y juega un rol crítico en el mecanismo de apoptosis en diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes [144]. En nuestro sistema, el tratamiento de células Y1 con LPS también produjo la activación de NFκB, determinada mediante el uso de un plásmido reportero. En forma concordante, experimentos de nuestro grupo de trabajo mostraron que dos horas después de la inyección i.p. de ratas con LPS se observa un incremento en los niveles nucleares de la subunidad p65 en la corteza adrenal. La expresión de NFκB, TLR4 y otros intermediarios de la vía en las células Y1 ya ha sido descrita en trabajos previos de nuestro laboratorio. Asimismo demostramos la participación de la vía de NFκB en la inducción de COX-2 y en el aumento en la esteroidogénesis producidos por LPS [90].

La vía de NFκB ha sido involucrada en la inducción de HO-1 por LPS en distintos sistemas [145]. Nuestros resultados indican que en las células Y1, la inducción de HO-1 por LPS también es mediada principalmente por el factor NFκB ya que la inhibición de su activación previno la estimulación del promotor de HO-1 y el aumento en los niveles proteicos de la enzima por LPS. Sin embargo, la sobreexpresión de p65, una de las subunidades de NFκB, disminuyó la actividad basal del promotor de HO-1.

De acuerdo a Gerritsen *et al* existe una interacción entre p65 y la familia de co-activadores implicados en el funcionamiento del aparato basal de transcripción, CBP/p300 [146]. Teniendo esto en cuenta, la inhibición de la expresión de HO-1 provocada por la sobreexpresión de p65 podría ser mediada por el secuestro de CBP/p300, lo que provocaría inhibición en la maquinaria de transcripción basal. Otros autores han sugerido que la interacción de p65 con CBP en el promotor de HO-1 provoca el reclutamiento de HDAC3 lo que generaría hipometilación de histonas y la consecuente represión del gen [147]. A su vez, como se describe más adelante, la fosforilación mediada por PKA (posiblemente de p65) podría ser imprescindible para lograr el efecto estimulador del LPS sobre la actividad del promotor de HO-1.

El AMPc es considerado un regulador ubicuo de reacciones inflamatorias e inmunológicas [148, 149]. Como ya se mencionó, luego de su activación por AMPc, la subunidad catalítica de PKA se desplaza al núcleo donde cataliza la fosforilación del factor CREB y la consecuente activación de genes específicos [150]. En las células Y1, nuestros resultados demuestran la participación de la actividad de PKA en la inducción de HO-1 por LPS ya que un inhibidor específico de esta quinasa bloquea la activación del promotor. El efecto del AMPc/PKA no involucraría al factor de transcripción CREB ya que no se detectó su activación en las células Y1 incubadas con LPS. Deben realizarse experimentos adicionales con otros inhibidores de PKA para confirmar la especificidad de este efecto

La participación de PKA en el mecanismo de acción de LPS ha sido demostrada en otros sistemas experimentales. A modo de ejemplo, Muroi y Suzuki demostraron que la activación de NFκB por LPS en la línea celular J774 (macrófagos de ratón) depende de los niveles de AMPc y la actividad de la PKA y es independiente de PKC [151] y Kato *et al* demostraron que la supresión de la expresión de la sialoproteína ósea (BSP) inducida por LPS en osteoblastos ROS 17/2.8 también depende de la activación de la PKA [152].

Se ha sugerido que la fosforilación de p65 mediada por PKA es un evento necesario para la inducción de los genes blanco de NFκB [153]. Tomando en cuenta las evidencias presentadas con respecto a la participación de la actividad de PKA, podemos hipotetizar que la inducción de HO-1 por LPS involucra la activación del factor NFκB y posiblemente también su fosforilación por PKA. No se descartan, sin embargo, efectos

de la PKA a otros niveles de la vía de transducción de señales. Deben realizarse experimentos adicionales con el fin de estudiar este mecanismo.

La inducción de HO-1 por LPS también puede involucrar otros factores de transcripción. En ese sentido el grupo de Perrella describió la activación por LPS del promotor murino de HO-1 en macrófagos, sugiriendo la participación de los factores Ets-1 y Elk-3 que se unen a sitios cercanos al inicio de la transcripción [26, 27].

Se ha postulado al estrés oxidativo como un mediador del efecto del LPS en diversos tipos celulares, y, en particular, se lo ha relacionado con la activación de factores de transcripción como NFκB [82, 154, 155]. En las células Y1, el tratamiento con LPS produjo un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno. Como se mencionó anteriormente, el incremento de ROS podría deberse al aumento en la generación de anión superóxido por la actividad exacerbada de la maquinaria mitocondrial esteroidogénica o también a la activación de los sistemas de NOS, xantino oxidasa y NADPH oxidasa [82, 156]. Este último sistema ha sido bien estudiado en células del sistema inmune en donde la producción aumentada de radical superóxido es utilizada como mecanismo de protección frente a un organismo patógeno [157]. Los resultados presentados permiten descartar la participación de la actividad de NADPH oxidasa en la inducción de HO-1 por LPS. Más aún, dado que el tratamiento con antioxidantes no tuvo efecto sobre la activación de NFκB, ni sobre los niveles proteicos de HO-1, concluimos que el estrés oxidativo no participa en la inducción de HO-1 por LPS.

También se ha involucrado a la vía de las MAPKs en el efecto del LPS a nivel celular [142]. En particular, Jiang y Ulevitch, demostraron la activación de la vía p38 en la inducción de la síntesis de interleuquinas en monocitos expuestos a LPS [158]. Nuestros resultados sugieren que la actividad de las MAPKs no es necesaria para el efecto estimulador del LPS sobre la activación de NFκB, ya que el tratamiento con inhibidores específicos para las tres cascadas de señalización no afectó en forma significativa la activación de NFκB por LPS en células Y1. A su vez, dado que estos inhibidores no modificaron los efectos del LPS sobre la activación del promotor de HO-1 o sobre el incremento en los niveles proteicos de HO-1, descartamos la participación de esta vía de señalización en el mecanismo de inducción de HO-1 por LPS. En suma, estos resultados nos permiten descartar la participación de las MAPKs en la activación de NFκB y del mecanismo de inducción de HO-1 por LPS.

En resumen, el efecto estimulador del LPS sobre la esteroidogénesis en las células Y1 [90] se acompaña de la activación del promotor de HO-1 y del incremento en los niveles proteicos de la enzima, sugiriéndose un efecto del LPS a nivel transcripcional. El mecanismo de inducción involucraría la activación del factor NFκB y la actividad de la quinasa PKA (en forma independiente de la activación del factor CREB). A su vez, es independiente del estrés oxidativo provocado por el tratamiento y no involucra la actividad de las vías de MAPKs.

El aumento en la actividad de HO-1 podría cumplir dos funciones relevantes: por un lado, como enzima del sistema antioxidante, protegiendo a la célula del estrés oxidativo generado por el estímulo de LPS y por otro, como modulador de la producción de esteroides adrenales inducida por LPS, como ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo [2]. En ese sentido, dado el efecto clave de los glucocorticoides en la inflamación, se evitan así respuestas desproporcionadas, en su duración y/o magnitud, que pueden resultar dañinas para el organismo.

7.4- Inducción de HO-1 por Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es considerado un mediador con un amplio espectro de funciones biológicas. Entre ellas, se incluye su habilidad de promover la supervivencia celular frente a estímulos estresores [159]. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la inducción de los sistemas de NOS y HO en corteza adrenal de ratas inyectadas con LPS y que el bloqueo de la actividad de NOS previene la inducción de HO-1 [2]. Estos resultados nos llevaron a sugerir que la inducción de HO-1 por NO forma parte de los mecanismos de defensa frente a situaciones de estrés celular [160].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el NO proveniente del generador DETA/NO es capaz de inducir la expresión de la enzima HO-1, un efecto que se observa a nivel del ARNm y de proteínas. A su vez, nuestros resultados indican que es necesaria la transcripción de genes para la inducción de HO-1 por NO, ya que ésta fue inhibida cuando las células se trataron con Actinomicina D.

Algunos autores sugieren que el aumento en los niveles de HO-1 por NO puede deberse a un proceso de estabilización de su ARNm [161]. En este sentido, Leautaud y Demple demostraron la inducción de HO-1 por estrés nitrosativo, a través de un mecanismo que involucra la estabilización del mensajero por inhibición de su desadenilación [162]. Alternativamente, en fibroblastos humanos tratados con NO se

sugirió la participación de la riboproteína HuR en este mecanismo [163]. En nuestro sistema, el aumento en del ARNm de HO-1 no parece involucrar un mecanismo de estabilización ya que el tratamiento no afectó su tasa de degradación. En suma, ya que el tratamiento con NO incrementa los niveles de ARNm de HO-1 sin afectar su estabilidad concluimos que el efecto del NO se debe exclusivamente a la activación de la transcripción del gen.

Sin embargo, notablemente, en nuestras condiciones experimentales no se observaron efectos del DETA/NO sobre la actividad del plásmido conteniendo el fragmento -4045,+74 del promotor murino de HO-1. Es posible que los elementos de respuesta necesarios no se encuentren en el fragmento clonado. En este sentido se han descrito sitios de respuesta ubicados a más de 4000 pb del inicio de la transcripción [105]. La inducción de HO-1 por NO también podría involucrar un mecanismo de regulación epigenético dependiente del contexto cromosómico. En ese sentido, Deshane *et al* demostraron que la inducción de HO-1 por hemina, en células de epitelio renal, depende de la interacción mediada por el factor sp1 del enhancer E1 (-4000 pb) con una región intrónica del gen [164]. Finalmente, este efecto podría ser inherente al sistema de detección utilizado, ya que se ha descrito un efecto inhibitorio del NO sobre la actividad de luciferasa de diversos plásmidos reporteros como se describe más adelante [165].

Dado que el NO puede combinarse con el anión superóxido para formar peroxinitrito, un potente agente oxidante, se ha sugerido que la inducción de HO-1 por NO puede involucrar la activación del factor de transcripción que sensible al estrés oxidativo, Nrf2 [30, 166].

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento de las células adrenales con DETA/NO disminuyó significativamente dos parámetros de estrés oxidativo (ROS y niveles de lipoperóxidos), posiblemente por el aumento concomitante de la actividad de sistemas antioxidantes, ya que junto con la inducción de HO-1 se detectaron aumentos en la expresión de otras enzimas antioxidantes de fase II como NQO1, GLCL y GLML. Para confirmar esta hipótesis deben repetirse las determinaciones con menores tiempos de exposición al NO (antes de la inducción de los sistemas antioxidantes).

La disminución en los niveles de GSH podría ser consecuencia de la generación de especies derivadas de la interacción directa entre GSH y NO. En este

sentido, Meloche *et al* describieron la formación de la especie S-nitrosoglutathion (GSNO) en células hepáticas de rata tratadas con un dador de NO [167].

De esta forma podemos sugerir que el tratamiento con dadores de NO provoca un desbalance redox que favorece la remoción de especies oxidantes a través de la activación/inducción de sistemas antioxidantes. En forma similar, se ha observado atenuación de la lipoperoxidación por generadores de NO en células endoteliales [168] y, en un modelo de daño renal [169].

Por otra parte, dado que el tratamiento con antioxidantes no previno la inducción de HO-1 por NO es probable que la generación de estrés oxidativo no participe del mecanismo de inducción de HO-1 por NO.

Se ha demostrado que el factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes y de fase II entre las que se incluyen: la glutatión S-transferasa (GST), la NADP(H): quinona oxidoreductasa (NQO1), la gamma-glutamylcisteína sintetasa (γ GCS) y la HO-1, entre otras [94, 160, 170]. En nuestro sistema experimental, el tratamiento con NO incrementó los niveles proteicos de Nrf2 y la expresión de los genes mencionados, lo que sugiere la activación del factor Nrf2.

Diversos estímulos incrementan la actividad transcripcional de Nrf2 provocando su disociación de Keap1 en el citosol, lo que conlleva un aumento en los niveles de la proteína ya que deja de ser degradada y se desplaza al núcleo donde se une a sus genes blanco [95]. Sin embargo, en nuestro sistema, el tratamiento con DETA/NO no afectó la actividad del plásmido reportero para Nrf2 ni la del plásmido conteniendo el promotor de HO-1, como ya se mencionó. Cabe destacar que la sobreexpresión del factor Nrf2 indujo un aumento en la actividad de los plásmidos reporteros de Nrf2, del enhancer E1 y del promotor de HO-1 murino (resultados mostrados en la sección ACTH/AMPC). Si bien todas las construcciones utilizadas han sido útiles para evaluar la activación de Nrf2 o la inducción de HO-1 por otros estímulos, es posible que su uso en este caso sea inadecuado ya que se ha demostrado que el NO disminuye la expresión de luciferasa por un mecanismo que involucra la disminución en la vida media de su mensajero, en forma independiente al promotor que regula su expresión [165]. En nuestro caso, la activación de los reporteros de Nrf2 o del promotor de HO-1, podrían estar enmascarados por la degradación del ARNm de luciferasa inducida por NO. El efecto inhibitorio del NO sobre la actividad de los plásmidos reporteros para los factores CREB y NF κ B podría también explicarse de esta forma.

Sin embargo, al menos en el caso de NFκB, se ha sugerido que el tratamiento con NO también podría inhibir la señalización por esta vía. En ese sentido, Kelleher *et al* demostraron que la S-nitrosilación de p65 inhibe la transcripción de genes dependientes de NFκB, y que existe una correlación inversa entre los niveles nucleares de p65 S-nitrosilado y la unión del heterodímero p50-p65 al ADN [171]. A su vez, los estudios de Park *et al* demostraron un novedoso mecanismo por el cual el NO rápidamente inactiva NFκB mediante la nitración de tirosinas de la subunidad p65 [172].

En conclusión, los resultados presentados no permiten descartar la participación de CREB o de NFκB en el mecanismo de acción de NO en las células Y1 y de hecho, ambos factores han sido descrito como mediadores de la respuesta celular al estímulo por NO en otros tipos celulares [24].

La activación del factor Nrf2 por fosforilación, mediada ERK1/2, JNK, PI3K o PKC, se ha postulado como uno de los mecanismos por los cuales el NO es capaz de inducir HO-1 [95].

En particular se ha demostrado que la exposición de células al NO resulta en la activación de la vía de PKC [123]. Este grupo de quinasas está compuesto por 10 isoformas clasificadas de la siguiente forma: *convencionales*, que requieren diacilglicerol (DAG), Ca^{2+} y fosfolípidos para su activación (α , β I, β II, γ); *noveles*, que requieren DAG pero no Ca^{2+} (δ , ϵ , η , θ) y *atípicas*, no requieren ni Ca^{2+} ni DAG para su activación (ι , ζ , N1, N2) [173].

Los resultados obtenidos con staurosporina (inhibidor de PKC y de otras quinasas), con inhibidores más específicos para PKC y con quelantes de calcio demuestran la participación de estas proteínas quinasas en el mecanismo de inducción de HO-1 por NO. Concluimos también que la isoforma ϵ de la PKC (independiente de Ca^{2+}) podría estar involucrada en este mecanismo. En este sentido, se ha postulado que el NO es capaz de modular la actividad de las PKC y se ha demostrado que dadores de NO producen la nitración post-traducciona l de la PKC ϵ , bloqueando su translocación y su activación [174]. A su vez, se ha demostrado que la vía PKC es capaz de mediar la inducción de HO-1 por distintos estímulos en varios tipos celulares [175-178].

Con respecto a la vía de PI3K, los resultados obtenidos indican su participación en el mantenimiento del tono basal de expresión de HO-1 en las células Y1, pero no en el mecanismo de inducción de HO-1 por NO. Estos resultados son consistentes con lo ya indicado con respecto a la actividad constitutiva de la vía PI3K-PKB/AKT en las

células Y1, que ha sido propuesta como una señal de sobrevida en células tumorales [179].

Se ha descrito que el NO tiene la capacidad de activar genes a través de las vías de las MAPKs [180]. En contraposición con lo publicado por Lee [181] sobre la participación de la generación de ROS y la activación de p38 y CREB en el mecanismo de inducción de HO-1, nuestros resultados, utilizando inhibidores específicos de las diferentes cascadas de MAPKS, indican que la inducción de HO-1 por NO en células Y1 es independiente de estas vías.

Finalmente se estudió la vía que involucra a la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la consecuente producción de GMPc como mediadora en la inducción de HO-1 por NO en las células Y1. Nuestros resultados, utilizando un análogo soluble del GMPc y un inhibidor específico de la GCs, nos llevan a concluir que el mecanismo de inducción de HO-1 por NO en células Y1 involucra la vía de GCs y la generación de GMPc. Resultados similares fueron obtenidos por Kurauchi *et al* en neuronas dopaminérgicas [182], por Immenschuh *et al* en hepatocitos, donde se observa que el GMPc induce HO-1 a través de un complejo formado por CREB/AP-1 [183], y por Polte *et al* en células endoteliales de pulmón bovino [74].

Se han demostrado mecanismos alternativos de activación del factor Nrf2. Entre ellos la modificación por S-nitrosilación, mediada por NO, de residuos de cisteína críticos en la proteína represora Keap1. Estas modificaciones en Keap1 pueden inhibir la degradación de Nrf2, lo que permite la acumulación de Nrf2 en el citoplasma y su consecuente movilización al núcleo [184]. La S-nitrosilación de Keap1 provoca la activación de Nrf2 y la inducción de HO-1 en células PC-12 [95].

Otra de las modificaciones que puede sufrir Keap1 es la S-guanilación. Se ha demostrado que el NO puede reaccionar con el GMPc para formar el nucleótido de guanina, 8-nitro-GMPc, que sería el agente guanilante de las cisteínas proteicas [185]. Análisis proteómicos demostraron la S-guanilación de Keap1 en la cisteína 434 y la consecuente activación de Nrf2, lo que corroboró el potencial de los derivados del NO para inducir los sistemas de defensa antioxidantes celulares [186].

En nuestro sistema experimental, la inducción de HO-1 por NO estaría mediada por el factor Nrf2, el cual, sería activado por fosforilación mediada por PKC, entre otras quinasas. No se descarta la participación adicional de la quinasa activable por GMPc, PKG. Por otro lado, la inducción de HO-1 por NO involucra la actividad de

la GCs lo que nos hace sugerir que la activación de Nrf2 también podría estar mediada por la S-guanilación de Keap1. Se trataría de mecanismos redundantes de activación de Nrf2 que asegurarían la inducción de HO-1 en estas condiciones.

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el momento indican que el NO es capaz de inducir la enzima HO-1 en células adrenales Y1. Esta inducción ocurre a nivel transcripcional descartándose un efecto del NO sobre la estabilidad del ARNm. Si bien el NO provoca alteraciones en parámetros de estrés oxidativo, éste no estaría directamente involucrado en la inducción de HO-1. Sugerimos además que la vía de transducción de señales que lleva a la inducción de HO-1 involucra la activación del factor Nrf2 mediante su fosforilación por PKC y posiblemente por la S-guanilación de Keap1. Deben realizarse experimentos adicionales con el fin de confirmar estas hipótesis.

7.5- Conclusiones finales

Múltiples evidencias experimentales indican que la inducción de HO-1 juega un papel importante en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos en distintos tipos celulares. Las implicancias biológicas de la reacción catalizada por la HO-1 han trascendido la descripción inicial de su función como la enzima limitante de la degradación del hemo en células del sistema reticuloendotelial. Actualmente se considera que los principales efectos de la HO-1 están asociados con su capacidad antioxidante debida a su actividad catabólica sobre el grupo hemo y a los efectos biológicos de los productos de la reacción, como se explicó anteriormente. Sin embargo, día a día se conocen otras funciones de la HO-1 más allá de las asociadas con la citoprotección. Entre ellas, se ha demostrado que la actividad de HO-1 participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, mejora la neovascularización, atenúa la inflamación y modula la respuesta inmune influenciando de esta forma la carcinogénesis, la cicatrización y la progresión de las enfermedades cardiovasculares.

En este estudio confirmamos que diferentes estímulos, a través de distintos mecanismos, inducen la actividad de HO-1 en células adrenales. Esta amplia capacidad de respuesta ante situaciones estresantes posiblemente esté asociada con su actividad, ya demostrada, como enzima antioxidante, aunque no se descartan otros efectos sobre la fisiología adrenal. En particular, se ha demostrado que la HO-1 actúa como modulador local de la esteroidogénesis adrenal, proceso clave en la regulación de la respuesta al estrés ya que una pequeña perturbación, sostenida en forma crónica, en los niveles sistémicos de glucocorticoides puede originar patologías metabólicas (por ej. Obesidad abdominal) o de comportamiento (por ej. depresión).

Dados sus múltiples efectos a nivel sistémico resulta entonces imprescindible el control de la producción de glucocorticoides por la corteza adrenal. En ese contexto, adquiere relevancia el estudio de los mecanismos involucrados en la inducción de HO-1 en la corteza adrenal, ya su conocimiento cabal permitirá el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas y adecuadas, diseñadas con el fin de controlar la expresión de esta enzima, y por ende la síntesis de esteroides adrenales, entre otros efectos de su actividad.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

8- Bibliografia

1. Pomeranic, Y., et al., *Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells*. J Endocrinol, 2004. **180**(1): p. 113-24.
2. Grion, N., et al., *Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex: involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production*. J Endocrinol, 2007. **194**(1): p. 11-20.
3. Connelly, M.A. and D.L. Williams, *SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(10): p. 467-72.
4. Gwynne, J.T., et al., *Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4329-33.
5. Stocco, D.M., *The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future*. J Endocrinol, 2000. **164**(3): p. 247-53.
6. Papadopoulos, V. and A.S. Brown, *Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 103-10.
7. Rone, M.B., J. Fan, and V. Papadopoulos, *Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(7): p. 646-58.
8. Hoeflich, A. and M. Bielohuby, *Mechanisms of adrenal gland growth: signal integration by extracellular signal regulated kinases1/2*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(3): p. 191-203.
9. Yasumura, Y., V. Buonassisi, and G. Sato, *Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype*. Cancer Res, 1966. **26**(3): p. 529-35.
10. Schimmer, B.P., *Adrenocortical Y1 cells*. Methods Enzymol, 1979. **58**: p. 570-4.
11. Lotfi, C.F., et al., *Proliferative signaling initiated in ACTH receptors*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(10): p. 1133-40.
12. Peri, A., et al., *Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(11): p. 5443-9.
13. Winnay, J.N. and G.D. Hammer, *Adrenocorticotropin hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(1): p. 147-66.
14. Mountjoy, K.G., et al., *Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells*. Physiol Genomics, 2001. **5**(1): p. 11-9.
15. Manna, P.R. and D.M. Stocco, *Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene*. J Mol Endocrinol, 2007. **39**(4): p. 261-77.
16. Lotfi, C.F. and H.A. Armelin, *cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells*. J Endocrinol, 2001. **168**(3): p. 381-9.
17. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.

18. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5887-94.
19. Drexler, S.K., et al., *Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(5): p. 216.
20. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
21. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
22. Schomer-Miller, B., et al., *Regulation of IkappaB kinase (IKK) complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15268-76.
23. Shoji, T., et al., *Involvement of p38 MAP kinase in lipopolysaccharide-induced production of pro- and anti-inflammatory cytokines and prostaglandin E(2) in human choriodecidua*. J Reprod Immunol, 2007. **75**(2): p. 82-90.
24. Tsatsanis, C., et al., *Signalling networks regulating cyclooxygenase-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1654-61.
25. Cymeryng, C.B., et al., *Induction of nitric oxide synthase activity in adrenal cells*. Endocr Res, 2000. **26**(4): p. 589-95.
26. Chung, S.W., Y.H. Chen, and M.A. Perrella, *Role of Ets-2 in the regulation of heme oxygenase-1 by endotoxin*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4578-84.
27. Chung, S.W., et al., *Endotoxin-induced down-regulation of Elk-3 facilitates heme oxygenase-1 induction in macrophages*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2414-20.
28. Rushworth, S.A., et al., *Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4408-15.
29. Singh, S. and A.K. Gupta, *Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(6): p. 1211-24.
30. Abbas, K., et al., *Nitric oxide activates an Nrf2/sulfiredoxin antioxidant pathway in macrophages*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 107-14.
31. Yun, H.Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Nitric oxide in health and disease of the nervous system*. Mol Psychiatry, 1997. **2**(4): p. 300-10.
32. Burnett, A.L., *Nitric oxide regulation of penile erection: biology and therapeutic implications*. J Androl, 2002. **23**(5): p. S20-6.
33. McCann, S.M., *The role of nitric oxide at hypothalamic and pituitary levels to alter the release of pituitary hormones: an invited commentary*. Eur J Endocrinol, 1996. **135**(5): p. 533-4.
34. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 175-95.
35. Boissel, J.P., P.M. Schwarz, and U. Forstermann, *Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation*. Nitric Oxide, 1998. **2**(5): p. 337-49.
36. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
37. Nathan, C., *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. FASEB J, 1992. **6**(12): p. 3051-64.

38. Cymeryng, C.B., et al., *Expression of nitric oxide synthases in rat adrenal zona fasciculata cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(4): p. 1235-42.
39. Cymeryng, C.B., L.A. Dada, and E.J. Podesta, *Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis*. *J Endocrinol*, 1998. **158**(2): p. 197-203.
40. Repetto, E.M., et al., *Characterization of L-arginine transport in adrenal cells: effect of ACTH*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(2): p. E291-7.
41. Van Voorhis, B.J., et al., *Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis*. *Endocrinology*, 1994. **135**(5): p. 1799-806.
42. Del Punta, K., E.H. Charreau, and O.P. Pignataro, *Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis*. *Endocrinology*, 1996. **137**(12): p. 5337-43.
43. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 5): p. 953-6.
44. Kensler, T.W., N. Wakabayashi, and S. Biswal, *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007. **47**: p. 89-116.
45. Motterlini, R., C.J. Green, and R. Foresti, *Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(4): p. 615-24.
46. Ahmed, K.A., et al., *Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling*. *Biochem J*, 2012. **441**(2): p. 719-30.
47. Leon, L., J.F. Jeannin, and A. Bettaieb, *Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis*. *Nitric Oxide*, 2008. **19**(2): p. 77-83.
48. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. **61**(2): p. 748-55.
49. Trakshel, G.M. and M.D. Maines, *Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(2): p. 1323-8.
50. Cruse, I. and M.D. Maines, *Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(7): p. 3348-53.
51. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. **37**: p. 517-54.
52. Maines, M.D., *The heme oxygenase system and its functions in the brain*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000. **46**(3): p. 573-85.
53. Agarwal, A. and H.S. Nick, *Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(5): p. 965-73.
54. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
55. Yachie, A., et al., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(1): p. 129-35.
56. Orozco-Ibarra, M., Y.I. Chirino, and J. Pedraza-Chaverri, *[Role of hemeoxygenase-1 in the neurodegenerative disorders]*. *Rev Neurol*, 2006. **43**(9): p. 556-62.

57. Ryter, S.W. and R.M. Tyrrell, *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties.* Free Radic Biol Med, 2000. **28**(2): p. 289-309.
58. Balla, J., et al., *Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9285-9.
59. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme.* Blood, 2002. **100**(3): p. 879-87.
60. Stocker, R., *Antioxidant activities of bile pigments.* Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(5): p. 841-9.
61. Mancuso, C., G. Pani, and V. Calabrese, *Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species.* Redox Rep, 2006. **11**(5): p. 207-13.
62. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.* Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 583-650.
63. Ozawa, N., et al., *Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress.* J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 457-67.
64. Piotrkowski, B., et al., *Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis.* J Endocrinol, 2009. **203**(1): p. 155-65.
65. Lyall, F., et al., *Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function.* FASEB J, 2000. **14**(1): p. 208-19.
66. Maines, M.D. and G.M. Trakshel, *Tin-protoporphyrin: a potent inhibitor of hemoprotein-dependent steroidogenesis in rat adrenals and testes.* J Pharmacol Exp Ther, 1992. **260**(2): p. 909-16.
67. Astort, F., et al., *High glucose-induced changes in steroid production in adrenal cells.* Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25**(5): p. 477-86.
68. Alam, J. and J.L. Cook, *How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(2): p. 166-74.
69. Uruno, A. and H. Motohashi, *The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles.* Nitric Oxide, 2011.
70. Sun, J., et al., *Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene.* EMBO J, 2002. **21**(19): p. 5216-24.
71. Immenschuh, S., et al., *The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures.* Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 483-91.
72. Durante, W., et al., *cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle.* Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 2): p. H317-23.
73. Kronke, G., et al., *Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein.* J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51006-14.
74. Polte, T., et al., *Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1209-15.
75. Kacimi, R., et al., *Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection.* Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 139-50.

76. Alam, J., et al., *Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(5): p. 924-33.
77. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(4): p. 625-32.
78. Juan, S.H., et al., *Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(1): p. 41-8.
79. Chen, J.C., K.C. Huang, and W.W. Lin, *HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 32-9.
80. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
81. Zhang, J., et al., *BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate HO-1 induction in response to oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 7942-52.
82. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
83. Alam, J. and J.L. Cook, *Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(30): p. 2499-511.
84. Camara, N.O. and M.P. Soares, *Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(4): p. 426-35.
85. Yuan, J.S., D. Wang, and C.N. Stewart, Jr., *Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification*. Biotechnol J, 2008. **3**(1): p. 112-23.
86. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
87. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
88. T Maniatis, E.F.F.a.J.S., *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York., 1982(Biochemical Education).
89. Donze, O. and D. Picard, *RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e46.
90. Martinez Calejman, C., et al., *Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFkappaB-dependent mechanism involving COX-2 activation*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **337**(1-2): p. 1-6.
91. Takahashi, T., et al., *[Protective role of HO-1 in oxidative tissue injuries]*. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2007. **130**(4): p. 252-6.
92. Soares, M.P., et al., *Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work?* Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 482-9.
93. Matsuoka, Y., M. Okazaki, and Y. Kitamura, *Induction of inducible heme oxygenase (HO-1) in the central nervous system: is HO-1 helpful or harmful?* Neurotox Res, 1999. **1**(2): p. 113-7.
94. Luo, C., et al., *The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: Aging and anti-aging*. Med Hypotheses, 2011.
95. Um, H.C., et al., *Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 161-8.

96. Morgan, E.T., et al., *Cytochromes P450 and flavin monooxygenases--targets and sources of nitric oxide*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(11): p. 1366-76.
97. Zuckerbraun, B.S., et al., *Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1099-106.
98. Wang, W.W., D.L. Smith, and S.D. Zucker, *Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats*. Hepatology, 2004. **40**(2): p. 424-33.
99. Jefcoate, C.R., et al., *ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells*. J Steroid Biochem, 1987. **27**(4-6): p. 721-9.
100. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
101. Simpson, E.R. and M.R. Waterman, *Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex*. Can J Biochem Cell Biol, 1983. **61**(7): p. 692-707.
102. Simpson, E.R. and M.R. Waterman, *Induction of synthesis of steroidogenic enzymes by corticotropin in bovine adrenocortical cells in culture*. Biochem Soc Trans, 1983. **11**(6): p. 653-5.
103. Funkenstein, B., et al., *Evidence for the presence of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in fresh granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and cyclic AMP on cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 synthesis and activity*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 10187-91.
104. Wang, X., et al., *The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20204-9.
105. Liu, X.M., et al., *Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 381-9.
106. Mattos, G.E. and C.F. Lotfi, *Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **245**(1-2): p. 31-42.
107. Lam, C.W., S.J. Getting, and M. Perretti, *In vitro and in vivo induction of heme oxygenase 1 in mouse macrophages following melanocortin receptor activation*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2297-304.
108. Oeseburg, H., et al., *Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1407-14.
109. Zhang, X., et al., *Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4459-64.
110. Matsuo, N., et al., *CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen XXIV gene (Col24a1) in osteoblasts*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5445-52.
111. Ying, L., B.J. Morris, and C.D. Sigmund, *Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2412-20.

112. Impey, S., et al., *Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions*. Cell, 2004. **119**(7): p. 1041-54.
113. Spiga, F., et al., *Temporal effect of adrenocorticotrophic hormone on adrenal glucocorticoid steroidogenesis: involvement of the transducer of regulated cyclic AMP-response element-binding protein activity*. J Neuroendocrinol, 2011. **23**(2): p. 136-42.
114. Du, K. and M. Montminy, *CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32377-9.
115. Mao, L.M., Q. Tang, and J.Q. Wang, *Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons*. Brain Res Bull, 2007. **72**(4-6): p. 302-8.
116. Persaud, S.J., et al., *Calcium/calmodulin-dependent kinase IV controls glucose-induced Irs2 expression in mouse beta cells via activation of cAMP response element-binding protein*. Diabetologia, 2011. **54**(5): p. 1109-20.
117. Carlezon, W.A., Jr., R.S. Duman, and E.J. Nestler, *The many faces of CREB*. Trends Neurosci, 2005. **28**(8): p. 436-45.
118. Forti, F.L., et al., *ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation*. Biochemistry, 2002. **41**(31): p. 10133-40.
119. Lotfi, C.F., et al., *Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29886-91.
120. Hanukoglu, I., et al., *Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(2): p. 489-98.
121. Rapoport, R., D. Sklan, and I. Hanukoglu, *Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence*. Arch Biochem Biophys, 1995. **317**(2): p. 412-6.
122. Raval, C.M. and P.J. Lee, *Heme oxygenase-1 in lung disease*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(12): p. 1532-40.
123. Takahashi, T., et al., *Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries*. Curr Med Chem, 2004. **11**(12): p. 1545-61.
124. Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. Genes Cells, 2011. **16**(2): p. 123-40.
125. Hur, W. and N.S. Gray, *Small molecule modulators of antioxidant response pathway*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(1): p. 162-73.
126. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
127. Le, T. and B.P. Schimmer, *The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4282-7.
128. Mukai, K., et al., *Adrenocorticotrophic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors*. Eur J Biochem, 1998. **256**(1): p. 190-200.
129. Herdegen, T. and J.D. Leah, *Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **28**(3): p. 370-490.

130. Schwab, M., et al., *A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells*. *Nature*, 1983. **303**(5917): p. 497-501.
131. Chan, T.O., S.E. Rittenhouse, and P.N. Tsichlis, *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 965-1014.
132. Hayakawa, J., et al., *Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein*. *Endocrinology*, 2002. **143**(1): p. 13-22.
133. Pugazhenthii, S., et al., *Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(15): p. 10761-6.
134. Richards, J.S., *New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(2): p. 209-18.
135. Aumo, L., et al., *Functional roles of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) 2 (EPAC2) in cAMP-mediated actions in adrenocortical cells*. *Endocrinology*, 2010. **151**(5): p. 2151-61.
136. Salinas, M., et al., *Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo*. *FEBS Lett*, 2004. **578**(1-2): p. 90-4.
137. Kostoglou-Athanassiou, I., et al., *Acute and subacute effects of endotoxin on hypothalamic gaseous neuromodulators*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **840**: p. 249-61.
138. Kostoglou-Athanassiou, I., et al., *Endotoxin stimulates an endogenous pathway regulating corticotropin-releasing hormone and vasopressin release involving the generation of nitric oxide and carbon monoxide*. *J Neuroimmunol*, 1998. **86**(1): p. 104-9.
139. Suzuki, S. and K. Nakano, *Possible role of endogenous histamine in mediation of LPS-induced secretion of corticosterone in mice*. *Biochem Pharmacol*, 1986. **35**(18): p. 3039-43.
140. Ryter, S.W. and A.M. Choi, *Cytoprotective and anti-inflammatory actions of carbon monoxide in organ injury and sepsis models*. *Novartis Found Symp*, 2007. **280**: p. 165-75; discussion 175-81.
141. Bach, F.H., *Heme oxygenase-1 as a protective gene*. *Wien Klin Wochenschr*, 2002. **114 Suppl 4**: p. 1-3.
142. Brown, J., et al., *TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk*. *J Dent Res*, 2011. **90**(4): p. 417-27.
143. Shapira, L., et al., *Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion*. *Infect Immun*, 1996. **64**(3): p. 825-8.
144. Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor, *Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(2): p. 135-42.
145. Sikorski, E.M., et al., *The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(3): p. F425-41.
146. Gerritsen, M.E., et al., *CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 2927-32.

147. Liu, G.H., J. Qu, and X. Shen, *NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 713-27.
148. Peters-Golden, M., *Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function*. *Sci Signal*, 2009. **2**(75): p. pe37.
149. Grandoch, M., S.S. Roscioni, and M. Schmidt, *The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(2): p. 265-84.
150. Gonzalez, G.A., et al., *A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence*. *Nature*, 1989. **337**(6209): p. 749-52.
151. Muroi, M. and T. Suzuki, *Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774*. *Cell Signal*, 1993. **5**(3): p. 289-98.
152. Kato, N., et al., *Regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription by lipopolysaccharide*. *J Cell Biochem*, 2006. **97**(2): p. 368-79.
153. Manna, S.K. and C. Gangadharan, *Decrease in RelA phosphorylation by inhibiting protein kinase A induces cell death in NF-kappaB-expressing and drug-resistant tumor cells*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(7): p. 1340-50.
154. Yao, H., et al., *Redox regulation of lung inflammation: role of NADPH oxidase and NF-kappaB signalling*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 1151-5.
155. Hoare, G.S., et al., *Role of oxidant stress in cytokine-induced activation of NF-kappaB in human aortic smooth muscle cells*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H1975-84.
156. Kolls, J.K., *Oxidative stress in sepsis: a redox redux*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(4): p. 860-3.
157. Rada, B. and T.L. Leto, *Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases*. *Contrib Microbiol*, 2008. **15**: p. 164-87.
158. Jiang, Y. and R.J. Ulevitch, *[The signal transduction of cell activation by LPS: the studies from CD14 to p38 MAPK]*. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 1999. **30**(1): p. 29-34.
159. Beltran, B., et al., *The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14602-7.
160. Li, C.Q., et al., *Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(34): p. 14547-51.
161. Demple, B., *Genetic responses against nitric oxide toxicity*. *Braz J Med Biol Res*, 1999. **32**(11): p. 1417-27.
162. Leautaud, V. and B. Demple, *Regulation of heme oxygenase-1 mRNA deadenylation and turnover in NIH3T3 cells by nitrosative or alkylation stress*. *BMC Mol Biol*, 2007. **8**: p. 116.
163. Kuwano, Y., et al., *Analysis of nitric oxide-stabilized mRNAs in human fibroblasts reveals HuR-dependent heme oxygenase 1 upregulation*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(10): p. 2622-35.
164. Deshane, J., et al., *Sp1 regulates chromatin looping between an intronic enhancer and distal promoter of the human heme oxygenase-1 gene in renal cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(22): p. 16476-86.
165. Fan, X., et al., *Nitric oxide donors inhibit luciferase expression in a promoter-independent fashion*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10232-8.

166. Ahmed, K.A., et al., *Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling*. *Biochem J*, 2011.
167. Meloche, B.A. and P.J. O'Brien, *S-nitrosyl glutathione-mediated hepatocyte cytotoxicity*. *Xenobiotica*, 1993. **23**(8): p. 863-71.
168. Malo-Ranta, U., et al., *Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein*. *FEBS Lett*, 1994. **337**(2): p. 179-83.
169. Gupta, A., et al., *Sodium nitroprusside and L-arginine attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats*. *Toxicology*, 2007. **232**(3): p. 183-91.
170. Cho, H.Y. and S.R. Kleeberger, *Nrf2 protects against airway disorders*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. **244**(1): p. 43-56.
171. Kelleher, Z.T., et al., *NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(42): p. 30667-72.
172. Park, S.W., et al., *Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(3): p. 300-9.
173. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. *Biochem J*, 1998. **332** (Pt 2): p. 281-92.
174. Balafanova, Z., et al., *Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 15021-7.
175. Chang, C.L., et al., *Insulin up-regulates heme oxygenase-1 expression in 3T3-L1 adipocytes via PI3-kinase- and PKC-dependent pathways and heme oxygenase-1-associated microRNA downregulation*. *Endocrinology*, 2011. **152**(2): p. 384-93.
176. Shih, R.H., et al., *Cigarette smoke extract upregulates heme oxygenase-1 via PKC/NADPH oxidase/ROS/PDGFR/PI3K/Akt pathway in mouse brain endothelial cells*. *J Neuroinflammation*, 2011. **8**: p. 104.
177. Zhang, H. and H.J. Forman, *Acrolein induces heme oxygenase-1 through PKC-delta and PI3K in human bronchial epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **38**(4): p. 483-90.
178. Terry, C.M., et al., *TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1493-501.
179. Viglietto, G., et al., *Contribution of PKB/AKT signaling to thyroid cancer*. *Front Biosci*, 2011. **16**: p. 1461-87.
180. Guix, F.X., et al., *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. *Prog Neurobiol*, 2005. **76**(2): p. 126-52.
181. Lee, S.A., et al., *The inhibitory effect of raloxifene on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 cells is mediated through a ROS/p38 MAPK/CREB pathway to the up-regulation of heme oxygenase-1 independent of estrogen receptor*. *Biochimie*, 2011. **93**(2): p. 168-74.
182. Kurauchi, Y., et al., *Nitric oxide-cyclic GMP signaling pathway limits inflammatory degeneration of midbrain dopaminergic neurons: cell type-specific regulation of heme oxygenase-1 expression*. *Neuroscience*, 2009. **158**(2): p. 856-66.

183. Immenschuh, S., et al., *Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes*. *Biochem J*, 1998. **334** (Pt 1): p. 141-6.
184. Kobayashi, A., et al., *Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(1): p. 221-9.
185. Ahmed, K.A., T. Sawa, and T. Akaike, *Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides*. *Amino Acids*, 2011. **41**(1): p. 123-30.
186. Fujii, S., et al., *The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(31): p. 23970-84.