

## Tesis de Posgrado

# Estudios del mecanismo molecular de acción del hexaclorobenceno sobre la expresión del gen de la enzima málica citosólica hepática

Loaiza Pérez, Andrea Irene

1998

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Loaiza Pérez, Andrea Irene. (1998). Estudios del mecanismo molecular de acción del hexaclorobenceno sobre la expresión del gen de la enzima málica citosólica hepática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3004\\_LoaizaPerez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3004_LoaizaPerez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Loaiza Pérez, Andrea Irene. "Estudios del mecanismo molecular de acción del hexaclorobenceno sobre la expresión del gen de la enzima málica citosólica hepática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3004\\_LoaizaPerez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3004_LoaizaPerez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Trabajo de Tesis para optar al Título  
de Doctora en Ciencias Biológicas**

**“ESTUDIOS DEL MECANISMO MOLECULAR  
DE ACCION DEL HEXACLOROBENCENO  
SOBRE LA EXPRESION DEL GEN DE LA  
ENZIMA MALICA CITOSOLICA HEPATICA”**

**Autora: Lic. Andrea Irene Loaiza Pérez**

**Directora: Dra. Pilar Santisteban Sanz**

**Codirectores: Dr. Horacio A. Sancovich  
Dra. Diana L. Kleiman**

**Marzo de 1998**

**Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.  
Buenos Aires, Argentina.**

**“STUDIES OF THE MOLECULAR MECHANISM  
OF ACTION OF HEXACHLOROBENZENE ON  
LIVER CITOSOLIC MALIC ENZYME GENE  
EXPRESSION ”**

A mis padres, Irene y Sergio, que me dan incondicionalmente todo el amor que necesito para crecer. Porque con su ejemplo me enseñaron a progresar y superarme permanentemente, conservando siempre la pureza del corazón. Son los mejores padres que pude haber tenido, los quiero con toda mi alma.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, la doctora Pilar Santisteban. Por haberme dirigido de una forma tan clara y eficaz lo cual me ha permitido definir esta etapa, terminando una tesis de la que estoy orgullosa. Ha sido mi modelo de lo que es un científico, seria pero no estructurada, un ser humano con todas las letras. El tiempo que pasé en su laboratorio fue la época donde más disfruté del trabajo investigación y más me divertí al mismo tiempo, en toda mi vida. Por todas esas cosas siempre la llevaré en mi corazón.

Al Dr. Horacio Sancovich, codirector de esta tesis. Por su calidad como ser humano. Por transmitirme su tranquilidad y solidez, dándome apoyo moral en los momentos difíciles y valorando mi trabajo permanentemente. Por alentarme a emprender todo lo que signifique mi crecimiento como profesional sin egoísmo.

A la Dra. Diana Kleiman, también codirectora. Por haberme ayudado a tener confianza en mi misma en los comienzos de mi trabajo. Por transmitirme permanentemente constancia y energía para trabajar.

A mis compañeros del laboratorio 221 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid (IIB), mis queridos Lourdes Ortiz, Antonio de la Vieja, José Carlos Moreno, Diego Medina, Isabel Barroso, Mercedes Navarrete, Maite Seisedos y Juan Angel Velazco. No quiero olvidarme de Eduardo Marquina, Fanny, Susana, Carmen, Puri y Alejandro. Porque además de ser excelentes compañeros puedo decir que casi todos son también mis amigos. Nunca pensé que esto podía pasar en un grupo de trabajo. Cuantos momentos felices compartidos. Gracias por haberme dado tanto afecto cuando estaba lejos de mi tierra y haber creado un clima genial en el laboratorio que hizo que tuviera tantas ganas de ir a trabajar todos los días. Siento que aunque estemos desperdigados por el mundo siempre seremos el grupo de compañeros del labo de Pilar.

En especial quiero agradecer a Lourdes Ortiz (Lulu) por ser tan solidaria en el trabajo y en la vida mientras estuve en Madrid. Aunque somos tan diferentes pudimos respetarnos mutuamente, pasar lindos momentos juntas y llegar a ser amigas.

También un agradecimiento especial a José Carlos Moreno, Antonino de la Vieja y Diego Medina, los tres en distintos momentos de mi estadia en Madrid han sido como hermanos compartiendo conmigo lo bueno y lo malo.

También a Maite Seisedos por haber colaborado tanto con mi trabajo en la última parte de la tesis.

A mis amigas del alma del IIB, Nieves Ibarrola y Ana Martínez, compañeras de aventuras, mi familia mientras estuve en Madrid. Tampoco quiero olvidarme de toda la gente con la compartí “cañas” en el Manilva tantas veces y que hicieron que mi vida fuera tan divertida, nunca los olvidaré.

A todo el personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid que por su eficiencia en el trabajo y calidez personal hacen de este, un lugar ideal en el mundo para hacer la tesis doctoral y nos hacen sentir que ser un “ex IIB” es un orgullo.

A toda la gente del laboratorio de Porfirinas, la Dra. Ana María Ferramola de Sancovich, Yolanda Sopena, Fernanda Spinelli y Lilia Lezcano por ser mi base de apoyo en todo momento para la realización de esta tesis.

En especial quiero agradecer a mi compañera y amiga Fer Spinelli, compañera de aventuras y apoyo incondicional en mis momentos de locura de esta tesis.

A todo el grupo de gente del laboratorio de la Dra. Diana Kleiman: Andrea Randi, Rodolfo Kölliker y Laurita Alvarez.

En especial a Andy Randi por ser tan solidaria y ayudarme con tanto cariño cuando más lo necesitaba. También a Kölliker por haberme brindado la calidez de sus mates y de su espíritu.

También un agradecimiento muy especial a mis amigos Silvina Pérez Martínez y Linus Spatz por haberme demostrado una vez más su cariño prestándome con tan buena disposición su Macintosh para hacer las figuras de esta tesis, una ayuda fundamental.

Por último agradezco a mis amigas del alma de Argentina: Suki Sequeira y Andre Ventura por ser compañeras de vida, es decir compartir los momentos buenos y malos, entre ellos las alegrías y angustias vividas durante esta tesis.

## **PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE ESTE TRABAJO DE TESIS:**

-“Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function”.Randi A., Sancovich H., Ferramola de Sancovich A.M., Loaiza Pérez A.I, Krawiek L. and Kleiman de Pisarev D. TOXICOLOGY(en prensa)

-“Regulación de la expresión genética de enzimas hormono-tiroideo dependientes en ratas intoxicadas con hexaclorobenceno”. Loaiza Pérez A., Kleiman D., Sancovich H., Randi A., Seisedos M., Ferramola A.M. y Santisteban P. Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo(RAEM). Seleccionado para su publicación entre los 12 mejores trabajos del X congreso de la SAEM.

-“Studies on the molecular mechanism of action of hexachlorobenzene on Malic enzyme gene expression”. Loaiza Pérez A.I., Kleiman de Pisarev D.L., Sancovich H.A., Randi A.S., Ferramola de Sancovich A.M. and Pilar Santisteban. Enviado a ENDOCRINOLOGY.

-“Effects of chronic administration of hexachlorobenzene on membrane proteins of rat hepatocytes” Randi A.S., Loaiza Pérez A.I., Ferramola de Sancovich A.M., Sancovich H.A., and Kleiman de Pisarev D.L. En preparación.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS REALIZADAS DURANTE ESTE TRABAJO DE TESIS:**

-“Regulación de la expresión genética de enzimas hormono-tiroideo dependientes en ratas intoxicadas con hexaclorobenceno”. Loaiza Pérez A., Kleiman D., Sancovich H., Randi A., Seisedos M.,Ferramola A.M. y Santisteban P. X congreso de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 6 al 9 de octubre de 1997.Buenos Aires, Argentina.Trabajo seleccionado entre los 12 mejores para su presentación oral, y para optar al “premio del X Congreso de SAEM”.

- “Regulation of thyroid hormone responsive enzymes gene expression in liver of hexachlorobenzene intoxicated rats. Loaiza Pérez A.I., Kleiman de Pisarev D.L., Sancovich H. , Randi A, Seisedos M.T. , Ferramola A.M., and Santisteban P. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Thyroid

Association(ATA), Colorado Springs, USA, Octubre 1997.

-"Identificación de elementos en cis y en trans en el promotor del gen del enzima málico citosólico que median su respuesta a dioxinas".Loaiza Pérez A.I., Seisdedos M.T. y Santisteban P. 20 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Madrid, España. 17 al 20 de septiembre de 1997.

-"Efecto del hexaclorobenceno sobre la expresión de la enzima málica en hígado de rata". Reunión Internacional de Sociedades de Investigación Bioquímica. Loaiza A., Kleiman de Pisarev D., Randi A., Sancovich H., Ferramola A.M. and Santisteban P. Reunión Internacional de Sociedades de Investigación Bioquímica. XXI Reunión Anual SAIB 1996. Pucón - Chile -Noviembre de 1996.

-"Molecular Mechanism of Action of Hexachlorobenzene on Malic Enzyme Gene Expression." Loaiza A., Kleiman de Pisarev D., Randi A., Sancovich H., Ferramola A.M. and Santisteban P.. 24 th meeting of European Biochemical Societies" FEBS , Barcelona, España.Julio de 1996.

-"Alteraciones funcionales tempranas de la membrana plasmática y microsomal hepáticas de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno". Randi A., Sancovich H.A., Loaiza Pérez A.I., Ferramola de Sancovich A.M, Krawiek L. y Kleiman de Pisarev D.L. XXX Reunión Anual SAIB 15 al 18 de noviembre de 1995.Córdoba- Argentina-Asistencia al congreso.

-"Efecto del hexaclorobenceno sobre proteínas de membrana plasmática de hígado de rata". Randi A., Loaiza Pérez A.I., Ferramola de Sancovich A.M., Sancovich H.A., Charreau E., Kleiman de Pisarev D.L.XXX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica.(SAIB), Iguazú, Misiones, Argentina. Noviembre de 1994.

-"Efecto del hexaclorobenceno sobre la fosforilación de proteínas de membrana y unión de factor epidermal de crecimiento en hígado de rata". Randi A., Ferramola de Sancovich A.M., Sancovich H.A., Loaiza Pérez A.I., Charreau E., Kleiman de Pisarev D.L. XXVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas. (SAIC), Mar del Plata, Argentina,21 al 24 de noviembre de 1993.

- "Efectos de Tóxicos aromáticos polihalogenados sobre la constituyentes de la membrana plasmática y microsomal de hígado de rata". Randi A.,



Ferramola de Sancovich A.M., Sancovich H.A., Loaiza Pérez A.I., Kleiman de Pisarev D.L. I Jornadas Nacionales y V Regionales de Medio Ambiente. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 1993.

# **INDICE**

## INDICE

<b><u>RESUMEN CASTELLANO</u></b> .....	<b>I</b>
<b><u>RESUMEN INGLES</u></b> .....	<b>II</b>
<b><u>ABREVIATURAS</u></b> .....	<b>III, IV</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>V, VI</b>

### **INTRODUCCION**

<b>1. El hexaclorobenceno - Aspectos generales.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Mecanismo molecular de acción de los tóxicos “tipo dioxina”.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Rol biológico del receptor de dioxinas (Ahr).....</b>	<b>5</b>
<b>4. Descripción de Ahr y Arnt como factores transcripción.....</b>	<b>8</b>
<b>5. La inducción de sistemas metabólicos degradativos es un efecto producido por un gran número de pesticidas.....</b>	<b>9</b>
<b>6. Efecto del HCB sobre enzimas lipogénicas .....</b>	<b>13</b>
<b>7. Función de la enzima málica dentro del metabolismo de los lípidos.....</b>	<b>13</b>
<b>8. La enzima málica, un buen modelo para el estudio del mecanismo de acción del hexaclorobenceno.....</b>	<b>17</b>
<b>8.1 Función y estructura de la enzima málica.....</b>	<b>17</b>
<b>8.2 El gen y su promotor.....</b>	<b>19</b>
<b>9. Hormonas y factores que regulan la expresión del gen de EM.....</b>	<b>24</b>
<b>9.A. Reguladores positivos.....</b>	<b>24</b>
<b>9.A.1. Hormonas tiroideas.....</b>	<b>24</b>
<b>9.A.1.1. Hormonas tiroideas-Mecanismo molecular de acción....</b>	<b>24</b>
<b>9.A.1.2. Efecto de las IIT sobre la expresión de genes hepáticos...30</b>	

9.A.2. Estabilización de los mensajeros: Hidratos de carbono.....	32
9.A.3. Insulina-¿un efecto secundario? .....	32
9.A.4. Proliferadores de peroxisomas.....	33
<b>9.B. Reguladores negativos</b>	
9.B.1. Inhibición por inductores de AMPc.....	37
9.B.2. El ácido retinoico es también un inhibidor.....	38
<b>9.C. Otros reguladores.....</b>	<b>38</b>

## **MATERIALES Y METODOS**

### **I. MATERIALES**

1. Animales de experimentación.....	42
2. Cultivos celulares.....	42
3. Productos utilizados.....	42
4. Plásmidos utilizados para la obtención de cDNAs.....	44
5. Plásmidos utilizados para transfecciones.....	45
6. Plásmido utilizado para la obtención de la ribosonda de TRB1 usada en los ensayos de protección a RNasa.....	45
7. Medios instrumentales .....	46

### **II. METODOS**

1. La rata como modelo experimental para el análisis de la expresión del gen de EM por ICB.....	47
1.1 <b><u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u></b> .....	47
1.1.a. Animales.....	47

1.1.b. Tratamiento de los animales.....	47
1.1.c. Procesamiento de las muestras.....	48
2. Determinación de la concentración de T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> .....	48
3. Determinación de la actividad 5'deiodinasa y 5 deiodinasa.....	48
4. Análisis de Scatchard.....	48
5. Regulación de los niveles de RNAm de EM.....	50
5.1. Extracción de RNA total.....	50
5.2. Selección de RNA mensajero.....	51
5.3. Separación de los RNAs por tamaños. Electroforesis.....	51
5.4. Transferencia de RNA a membranas de Nytran.....	52
5.5. Obtención y marcaje de las sondas.....	52
5.6. Hibridación y lavado de las membranas.....	53
5.7. Autoradiografía y cuantificación.....	54
6. Ensayos de retardo en gel.....	54
6.1. Oligonucleótidos usados y su marcaje.....	55
6.2. Preparación de extractos nucleares de células.....	57
6.3. Extractos nucleares de hígado.....	57
6.4. Unión de proteínas al DNA.....	58
6.5. Separación del complejo DNA-proteína.....	59
7. Ensayo de protección a RNasa.....	59
8. Ensayo de western-blot.....	61
9. Las líneas celulares de hepatoma H-35 y HepG2 como modelo para el análisis de la influencia del IICB sobre la expresión del gen de EM.....	62
9.1. Medio de cultivo.....	62
9.2. Transfecciones transitorias.....	62
9.2.a. Células y tratamientos.....	62
9.2.b. Plásmidos utilizados.....	63
9.3. Ensayo de cloranfenicol acetil transferasa (CAT).....	63
9.4. Ensayo de luciferasa.....	65

## RESULTADOS

1. Efecto del HCB sobre enzimas hormono-tiroideo dependientes.....	66
1.1. Expresión del gen de la enzima málica en hígado.....	66
1.2. Expresión de otros genes metabólicos regulados por hormonas tiroideas.....	68
1.3. Expresión de enzimas mitocondriales reguladas por hormonas tiroideas.....	71
2. Las hormonas tiroideas como posible blanco de acción del HCB en el proceso de transcripción del gen de EM.....	73
2.1. Niveles de T <sub>4</sub> y T <sub>3</sub> en tejido hepático.....	73
2.2. Actividad 5'deiodinasa y 5 deiodinasa.....	75
2.3. Estudio de la constante de afinidad y el n° de sitios receptores de T <sub>3</sub> (RT <sub>3</sub> ) hepáticos en ratas intoxicadas con HCB.....	76
2.4. Efecto del tratamiento con HCB sobre los niveles de RNAm de RT <sub>3</sub> hepático (TRB1).....	77
2.5. Estudio de la posible influencia del HCB sobre la formación de complejos DNA/proteína sobre el elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) del promotor de EM.....	77
3. Posible influencia del HCB sobre HNF-3.....	85
3.1. Interacción de HNF-3 con el DNA en ratas intoxicadas con HCB.....	85
3.2. Estudios de los niveles de RNAm de HNF-3 en hígado de ratas tratadas con HCB.....	87
4. El complejo AP1 como posible blanco de acción del HCB.....	90
5. Papel de PPAR en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB.....	93
6. Papel de Sp1 en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB.....	98
7. Papel de CREB en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB.....	98
8. Estudios realizados con células.....	100
8.1. Efecto del HCB sobre los niveles de RNAm de EM en la línea de hepatoma HepG2.....	100
8.2. Efecto del HCB sobre los niveles de RNAm de GAPDH en células de	

hepatoma.....	102
8.3. Detección de la zona del promotor de EM involucrada en la regulación positiva de dicho gen por HCB.....	104
8.4. Regulación de la expresión del gen de EM através del elemento TRE utilizando células de hepatoma.....	106

## DISCUSIÓN

1. Papel de las IIT en la inducción de la expresión del gen de EM por HCB.....	111
2. Papel del complejo API.....	118
3. Papel de PPAR.....	120
4. Papel de la proteína CREB.....	121
5. Papel del factor de transcripción Sp1.....	123
6. Papel de oligonucleótidos de la familia “fork head” en la regulación de EM.....	125

<u>CONCLUSIONES</u> .....	131
---------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	134
---------------------------	-----

## Resumen

### **"Mecanismo molecular de acción del hexaclorobenceno sobre la expresión del gen de la enzima málica citosólica hepática"**

Autora: Lic. Andrea Loaiza Pérez

Directora: Dra. Pilar Santisteban Sanz

Codirectores: Dr. Horacio A. Sancovich

Dra. Diana L. Kleiman

El hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico ambiental ampliamente distribuido en la biosfera. La exposición crónica de animales de laboratorio al HCB produce importantes efectos biológicos tales como desencadenamiento de porfiria, inducción de enzimas microsomales hepáticas, disfunciones tiroideas, inmunosupresión y carcinogénesis. Trabajos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que el HCB incrementa la actividad de enzimas lipogénicas hepáticas reguladas por hormonas tiroideas (HT) tales como la enzima málica (EM). En este trabajo hemos demostrado que el HCB provoca un incremento en los niveles de RNAm de EM hepática, siendo este efecto a nivel transcripcional. Estudios de los elementos en cis y en trans que median la respuesta descripta revelaron que el pesticida provoca la inducción de un complejo proteico sobre el elemento de respuesta a HT (TRE) presente en el promotor de EM, el cual presenta un 64% de homología con el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE). RT3 no está involucrado en forma directa en dicha inducción aunque su presencia sería necesaria para dicha estimulación. Otros factores de transcripción tales como Ahr o factores de la familia "fork head" formarían parte del complejo inducido.

Palabras claves: enzima málica hepática, hexaclorobenceno, factores de transcripción, RT<sub>3</sub>, XRE.



Abstract

**“Molecular mechanism of action of hexachlorobenzene on liver  
cytosolic malic enzyme gene expression”**

Author: Lic. Andrea Loaiza Pérez  
Director: Dra. Pilar Santisteban Sanz  
Codirectors: Dr. Horacio A. Sancovich  
Dra. Diana L. Kleiman

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread environmental pollutant. Chronical exposure of laboratory animals to HCB causes a number of biological effects such as triggering porphyria, microsomal enzyme induction, thyroid dysfunction, immunosuppression and carcinogenesis. Previous data of our laboratory have demonstrated that HCB increases the activity of thyroid-responsive lipogenic enzymes such as malic enzyme (ME). In this work we have demonstrated that HCB increases ME mRNA levels as a consequence of stimulation of the transcription process. We have studied cis and trans elements that mediate that phenomena. Our data reveal that HCB induces protein/DNA complexes formed on TRE of ME promoter, that has a 64% of homology with consensus xenobiotic response element (XRE).  $RT_3$  would not be involved directly in that regulation but its presence would be necessary. Other transcription factors such as Ahr or fork head family members could participate in the HCB-induced complex formed on TRE.

Key words: malic enzyme, hexachlorobenzene, transcription factors,  $RT_3$ , XRE.

# ABREVIATURAS

Ahr	receptor de compuestos aril hidrocarbonados
Arnt	transportador nuclear de Ahr
AP1	complejo Jun/Fos
AMPc	adenosin-3'-5'-monofosfato cíclico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
AcoA	acil coA oxidasa
AR	ácido retinoico
CYP	citocromo P450
CREB	proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc
CRE	elemento de respuesta a AMPc
cDNA	DNA copia
CAT	cloranfenicol acetiltransferasa
Ci	curie
d CTP	deoxicitidina 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
DNA	ácido desoxirribonucleico
DDT	1,1,1-tricloro-2,2,di(clorofenil)etano
5'D	5'deiodinasa
5 D 5	deiodinasa
EDTA	ácido etilen-diaminotetracético
EMSA	ensayo de retardo en gel
EGFr	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EM	enzima málica citosólica
EN	epinefrina
G6PDH	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
6PGDH	6 fosfogluconato deshidrogenasa
$\alpha$ -GPD	$\alpha$ gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GAPDH	gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GH	hormona de crecimiento
HNF-3	factor nuclear de los hepatocitos N° 3
HCB	hexaclorobenceno
HT	hormonas tiroideas
HSP	proteínas "heat shock"
bHLH	hélice-vuelta-hélice básica
IE	genes de respuesta temprana
IRE	elemento de respuesta a insulina

kb	kilobases
LUC	luciferasa
MOPS	ácido 3- (N-morfolino) proanesulfónico
MAPKs	proteínas quinasas activadas por mitógenos
NADPH	nicotinamida adenina difosfato
PCBs	bifenilos policlorados
PPAR	receptor activado de proliferadores de peroxisomas
PPRE	elemento de respuesta a proliferadore de peroxisomas
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoruro
pb	pares de bases
PTK	proteínas tirosinas quinasas
RIA	radioinmunoensayo
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensajero
RT <sub>3</sub>	receptor de T <sub>3</sub>
RARE	elemento de respuesta a ácido retinoico
Rnasa	ribonucleasa
RAR	receptor de ácido retinoico
RXR	receptor de retinoide X
rT <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> reversa
SDS	dodecil sulfato sódico
TAM	tejido adiposo marrón
TRE	elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TCDD	tetraclorodibenzo-p-dioxina
T <sub>3</sub>	tetraiodotironina
T <sub>3</sub>	triiodotironina
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
tris	tri ( hidroximetil) aminometano
TTF-2	factor de transcripción de tiroides 2
TRACs	cofactores asociados al receptor de hormonas tiroideas
TSH	tirotropina
VD3RE	elemento de respuesta a vitamina D3
XRE	elemento de respuesta a xenobióticos

# **OBJETIVOS**

El hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico ambiental ampliamente distribuido en la biosfera. La exposición crónica de animales de laboratorio al HCB produce importantes efectos biológicos tales como desencadenamiento de porfiria, inducción de enzimas microsomales hepáticas, disfunciones tiroideas, inmunosupresión y carcinogénesis. Trabajos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que el HCB incrementa la actividad de enzimas lipogénicas hepáticas reguladas por hormonas tiroideas (HT) tales como la enzima málica (EM).

El principal objetivo de este trabajo ha sido estudiar en que forma la intoxicación con HCB influye sobre la regulación de la expresión del gen de EM.

Nos propusimos entonces como primer objetivo de este trabajo estudiar si el HCB afectaba los niveles de RNAm de la EM hepática.

De acuerdo a estos resultados el siguiente objetivo fue ver si el efecto del pesticida es ejercido a nivel de la regulación de la transcripción del gen que codifica dicha enzima.

Luego se trató de determinar cuales de los factores que regulan la transcripción del gen de la EM estaban afectados por el tratamiento con el pesticida. Para esto se analizó el rol de los siguientes factores de transcripción:

- El receptor de hormonas tiroideas (RT<sub>3</sub>)
- El complejo AP1 (dímero jun/fos)
- El receptor activado de proliferadores de peroxisomas (PPAR)
- El factor SP1
- La proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB)

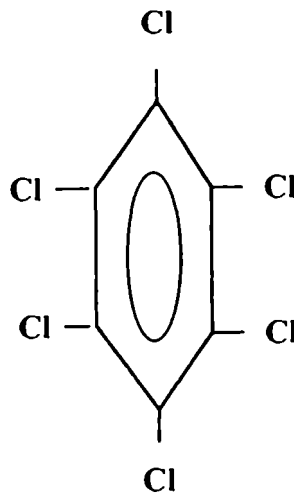
Se estudió luego la posible existencia en el promotor de EM de sitios de homología con el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE).

Como corolario se propuso un modelo que aclare y explique el significado fisiológico de la regulación de la expresión del gen de EM en la intoxicación con HCB.

# **INTRODUCCION**

### 1. El hexaclorobenceno - Aspectos generales -

El (HCB) es un contaminante ambiental ampliamente distribuido en la biosfera. En cuanto a su estructura química se lo clasifica como un compuesto organoclorado. Fue utilizado como fungicida y actualmente es liberado al medio ambiente como subproducto de la manufactura de otros compuestos orgánicos polihalogenados. También se lo encuentra como contaminante de otros pesticidas de amplio uso.



Además del HCB pertenecen a esta familia el aldrin, dieldrin, lindano, 1,1,1-tricloro-2,2-di (clorofenil) etano (DDT), toxafeno y endrin. Los compuestos organoclorados fueron los primeros insecticidas comercializados.

Estas sustancias son muy estables y persistentes, y debido a que son no polares se concentran en el tejido adiposo, así también como en el componente graso de la leche materna (1). En varios países de América

Latina, incluidos Argentina, Venezuela, Nicaragua, Costa Rica, Uruguay y México, se han realizado estudios sobre la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en el tejido adiposo humano, encontrándose con elevada frecuencia altos niveles de DDT y sus metabolitos, seguidos por dieldrin y HCB (2).

En conjunto, las sustancias organocloradas tienen una toxicidad aguda relativamente baja, exceptuando al aldrin y endrin. Debido a que su absorción ocurre gradualmente en pequeñas cantidades y sus consecuencias se manifiestan a largo plazo podemos decir que tienen un efecto de toxicidad crónica. Al encontrarse acumulados en el tejido adiposo y absorberse lentamente, los organismos se encuentran expuestos en forma prolongada a dosis bajas del plaguicida.

Los principales metabolitos del HCB son la tetrahidroquinona y pentaclorofenol, los cuales producen efectos tóxicos “per se” (3).

En cuanto a su modo de acción el HCB puede ser considerado como un tóxico “tipo dioxina”. Se ha demostrado que este tipo de compuestos ejercen su acción intracelular a través de su interacción con el receptor citosólico de compuestos aril hidrocarbonados (Ahr). Pertenecen además a este grupo de compuestos las dibenzo-para-dioxinas polihalogenadas, dibenzofuranos, bifenilos policlorados (PCBs), naftalenos e hidrocarburos poliaromáticos.



Ha sido demostrado que la exposición crónica de animales de laboratorio al HCB produce efectos tales como porfiria (4, 5), inducción de enzimas microsomales hepáticas (6), disfunciones reproductivas (7,8), alteraciones en el metabolismo de hormonas tiroideas (HT) (9, 10), inmunosupresión (11) y carcinogénesis (12, 13). La administración crónica de HCB a ratas durante un año o más provoca la formación de tumores hepáticos descritos como carcinomas hepatocelulares, hepatomas o hemoangiomas (12). Se conoce también que otros tóxicos tales como los PCBs, y bifenilos polibrominados producen anomalías tiroideas. Se han descrito también algunos casos de carcinoma de tiroides como consecuencia de la intoxicación con estos pesticidas. Por otro lado ha sido descrito que la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), el congénere más tóxico de la familia de las dioxinas y el HCB estimulan la actividad de UDP-glucuroniltransferasas hepáticas (14, 15), entre otras las responsables del catabolismo de tiroxina ( $T_4$ ) y triiodotironina ( $T_3$ ) lo cual conduciría a alteraciones en los niveles de dichas hormonas causadas por este tipo de pesticidas. Entre 1955 y 1959 varios miles de personas se intoxicaron en Turquía tras la ingestión de semillas de trigo fumigadas con HCB encontrándose además de un cuadro de porfiria similar a la porfiria cutánea tarda, anomalías en la función tiroidea de los pacientes sobrevivientes (16).

## 2. Mecanismo molecular de acción de los tóxicos “tipo dioxina”

El mecanismo de acción del TCDD ha sido uno de los más estudiados. Se ha propuesto que todos los pesticidas que actúan a través de su unión al Ahr comparten con el TCDD el mismo mecanismo molecular de acción. Estos compuestos entran a la célula por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y se unen al complejo formado por proteínas “heat shock” (HSP 90, 70 y 50), una proteína quinasa (SRC) y el receptor Ah (Ahr).

Después de su unión con el ligando, Ahr abandona el complejo y se transloca al núcleo donde forma un heterodímero con la proteína Arnt (transportador nuclear de Ahr). Este heterodímero modula la expresión de genes que poseen en sus promotores elementos específicos de respuesta a xenobióticos (secuencias XRE) (**Fig 1 camino 1**). Por otro lado la proteína quinasa del complejo (SRC) inicia una cascada de fosforilaciones. Se ha descrito que la interacción del TCDD con Ahr induce la fosforilación de proteínas de membrana tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr), produciendo la activación de Ras y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), ocasionando eventualmente la fosforilación de factores de transcripción nucleares como AP1 (complejo Jun/Fos), los cuales activan genes de respuesta temprana (“immediate early

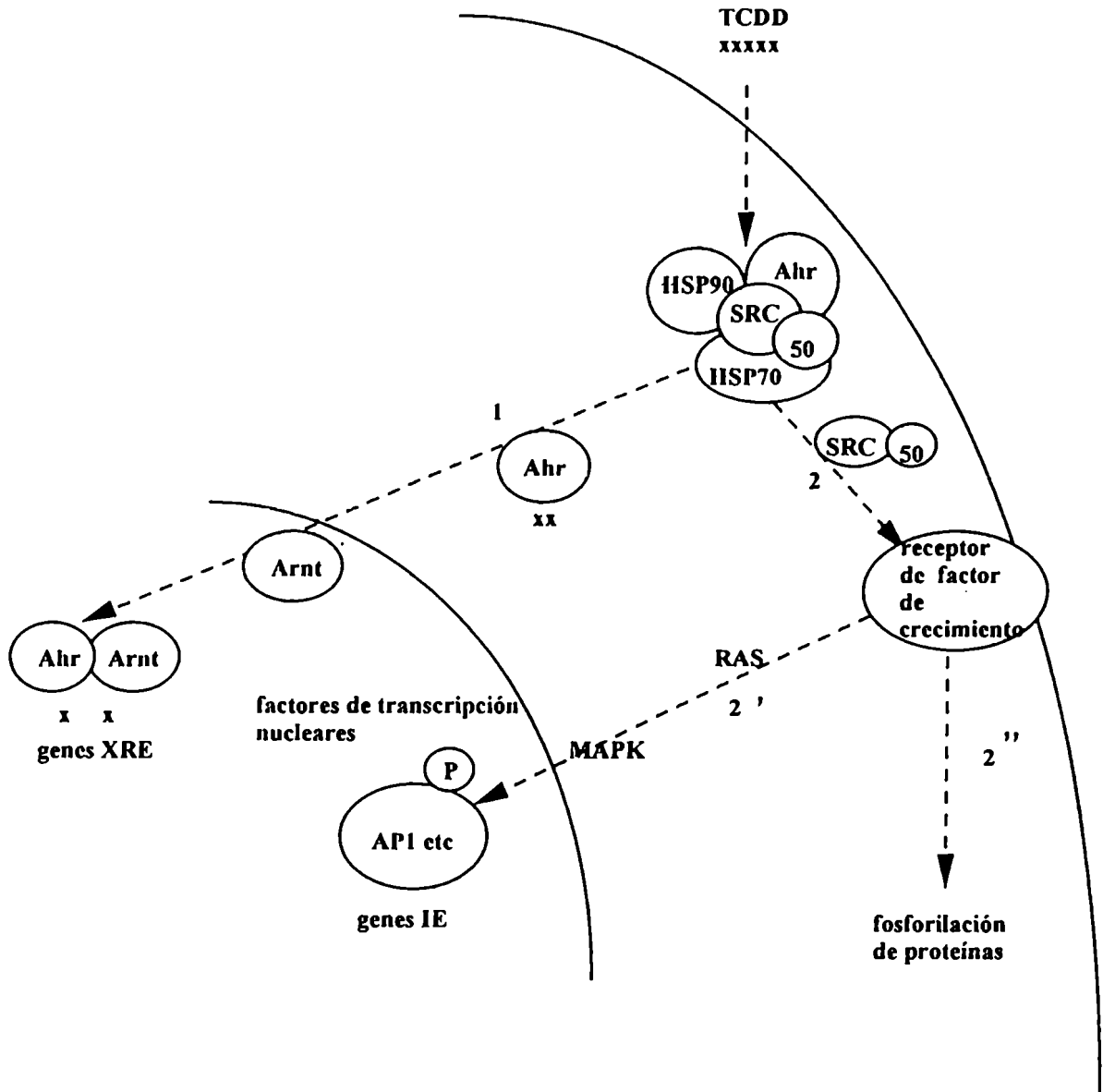
genes” o IE) (**Fig 1 camino 2**). Este camino no requiere la interacción inducida por ligando de Ahr con las secuencias XRE.

En el citosol, el SRC liberado, podría producir la fosforilación directa de otras proteínas importantes del citosol, membrana plasmática y organelas intracelulares (**Fig.1 camino 2''**) causando cambios funcionales en los mismos (17).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio (18) han demostrado que el camino de señales de transducción de factores de crecimiento (camino 2) es activado por HCB.

### **3. Rol biológico del receptor de dioxinas (Ahr)**

En animales de laboratorio el Ahr funcional es requerido para mediar los efectos tóxicos de las dioxinas (TCDD), benzopirenos del humo de cigarrillo y otros productos de combustión como PCBs y befinilos polibrominados. El Ahr es expresado constitutivamente en muchos tejidos de mamíferos. Altas cantidades de RNA<sub>m</sub> de Ahr fueron encontradas en hígado, riñón, pulmón, corazón, timo y placenta. Han sido descriptos una serie de genes inducidos por dioxinas como los de algunas isoformas del citocromo P450 (CYP) tales como CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, enzimas como UDP-glucuronosyl-transferasas (Ugts) y factores de crecimiento. El rol que el Ahr ejerce en procesos mediados por dioxinas como



**Fig.1 Esquema hipotético del camino de fosforilación de proteínas activado por TCDD.** Después de entrar a la célula a través de la membrana plasmática (círculo externo) encuentra al complejo del receptor Ah (Ahr) que consiste en proteínas "heat shock" (HSP) 90, 70 y 50, una proteína quinasa, SRC y Ahr. Después de la reacción de "binding", el receptor Ah unido al TCDD, abandona el complejo y se mueve hacia el interior del núcleo (círculo interno), con la ayuda de un segundo factor de transcripción, Arnt (camino 1). Al mismo tiempo, la partida de Ahr unido al ligando del complejo de proteínas HSP, libera a SRC y de esta manera activa su actividad de proteína quinasa (camino 2), lo cual activa el "camino de señales de transducción de factores de crecimiento" (camino 2') a través de la activación de la activación de la proteína RAS y MAP-quinasa (MAPK) produciendo eventualmente la fosforilación de factores de transcripción tales como AP1. Estos factores activan "genes de respuesta temprana" (genes IE). La activación de SRC en el citosol, al mismo tiempo, podría ocasionar la fosforilación de otras importantes proteínas en el citosol, la membrana plasmática (por ej. receptores de factores de crecimiento) y otras organelas intracelulares (camino 2'') causando cambios funcionales en los mismos.

teratogénesis, apoptosis, inmunosupresión y proliferación de algunos tipos celulares podría explicarse teniendo en cuenta que este factor de transcripción regula funciones vitales críticas. Se ha demostrado que en hígado de ratones “knock out” para Ahr ( $Ahr^{-/-}$ ) la inducción de CYP1A1 y Ugt106 por dioxinas queda abolida, incluso la actividad enzimática basal disminuye un 90%, lo cual demuestra que aún en ausencia de ligando el Ahr controla la expresión basal de estos genes. Estos datos sugieren que un ligando endógeno podría estar ocupando el sitio de unión del Ahr, permitiendo su interacción con ciertos elementos de respuesta a Ahr, pero no se conoce aún cual sería el ligando natural de este receptor.

Estos ratones  $Ahr^{-/-}$  no presentaban anomalías histológicas en ningún órgano salvo en el hígado, en el cual se desarrolla una pronunciada fibrosis en el tracto portal. Es extremadamente raro que este tipo de fibrosis se desarrolle espontáneamente en ratones ya que sólo puede ser inducida por hepatotoxinas. Se ha postulado que el Ahr puede ejercer un efecto protector contra toxinas endógenas o químicos de la dieta, durante el desarrollo.

Los ratones  $Ahr^{-/-}$  también presentan deficiencias en el sistema inmune. Poseen un menor desarrollo del timo y la cantidad de linfocitos que salen a tejidos periféricos como el bazo y nódulos linfáticos está disminuida (19).

### **4. Descripción de Ahr y Arnt como factores de transcripción**

El Ahr pertenece a la superfamilia hélice-vuelta-hélice básica (bHLH) y su acción como factor de transcripción es activada por su unión al ligando y dimerización con Arnt.

Los factores de transcripción bHLH de mamíferos se caracterizan por tener un dominio de unión al DNA (región básica) y un dominio de dimerización (HLH) altamente conservados. Estos factores de transcripción y otros relacionados, los bHLH/Zip (cierres de leucinas), están frecuentemente involucrados en diferenciación y proliferación de tipos celulares específicos.

La mayoría de los factores bHLH y bHLH/Zip se unen como dímeros al motivo consenso CANNTG conocido como caja E, donde los dos nucleótidos centrales son comúnmente GC o CG. Se ha descrito que la región básica reconoce a la caja E y el motivo HLH forma un paquete de cuatro hélices enroscadas sobre el DNA.

El Arnt es un factor que pertenece a la familia de los bHLH. El Arnt y el Ahr contienen una región denominada PAS la cual está altamente conservada en ambos, así como en *Drosophila* en el factor regulador del desarrollo (Sim) y la proteína reguladora del ritmo circadiano (Per). El motivo central de la secuencia XRE (TNGCGTG) presenta una muy baja homología con el motivo consenso de la caja E y notoriamente no es

reconocido por Arnt o Ahr en forma individual. Tampoco el heterodímero Arnt-Ahr activado por dioxinas puede unirse al motivo de la caja E.

El Arnt parece ser una proteína nuclear constitutiva; su función en las células no estimuladas con dioxinas aún no ha sido dilucidada. El sistema de receptor de dioxina provee el primer ejemplo de dimerización de factores bHLH controlada por ligando (20).

### **5. La inducción de sistemas metabólicos degradativos es un efecto producido por un gran número de pesticidas**

El llamado fenómeno de “inducción” provocado por un gran número de tóxicos ambientales (xenobióticos) es el aumento en la actividad y los niveles de RNAm de algunas enzimas cuya función es la detoxificación. El ejemplo mejor conocido es la inducción de los CYP por varios xenobióticos que resulta en un incremento en el título total de las proteínas de dicho citocromo, particularmente en el hígado. En los promotores de algunos genes de enzimas del CYP existen secuencias XRE a las cuales se une el complejo de Ahr activando la transcripción de los mismos (21).

Entre los tóxicos que inducen el CYP podemos citar como ejemplo a los que ejercen su acción a través del Ahr tales como las dioxinas, 3 - metil colantreno y compuestos organoclorados como el HCB. Otros tóxicos provocan inducción actuando independientemente de Ahr tales como el

piperonil butóxido y el acetilnaftaleno (22). Las proteínas del CYP, localizadas en el retículo endoplasmático liso de la célula, son componentes vitales de sistemas de degradación oxidativa y su función es detoxificar al organismo de compuestos químicos foráneos. En algunos casos la inducción ocurre a las pocas horas y en otros a los pocos días de intoxicación. El fenómeno de inducción ocurre no sólo para el CYP sino también para otros sistemas como el de la glutatión transferasa, glucuronil transferasas y otras oxidasas. Este fenómeno ha sido interpretado por algunos investigadores como una estrategia defensiva de los animales para enfrentar la agresión producida por químicos foráneos incrementando los sistemas de detoxificación y sus cofactores. La estrategia anteriormente propuesta tiene sentido teniendo en cuenta que la mayor parte de los xenobióticos lipofílicos pueden sólo ser excretados después de ser metabolizados y subsecuentemente conjugados. Es importante considerar que la inducción ocurre a dosis mucho menores que las letales, es decir que se trata de un fenómeno subrepticio que proporciona protección contra estos tóxicos durante largos períodos.

Los distintos pesticidas inducen diferentes sistemas de detoxificación. Incluso dentro de los que interactúan con Ahr existen diferencias. En particular se ha descrito que el HCB produce porfiria hepática en un mecanismo que involucra la inducción de las isoformas del



CYP, CYP1A1 (P450c) y CYP1A2 (P450d) (22). Este pesticida induce un incremento en la cantidad de RNAm de ambas enzimas indicando que la inducción es a nivel de la transcripción y que la misma podría ser mediada por Ahr. La inducción de CYP1A2 causada por HCB fue mayor que la observada para el TCDD el cual induce principalmente CYP1A1. También el HCB induce isoformas de citocromos no inducidas por TCDD tales como P450IIB1 (P450b) y P450IIB2 (P450e). Estas isoformas son también inducidas por fenobarbital el cual no actúa a través de receptor alguno. También ha sido descrito que el citocromo P4503A4 tendría un rol en el metabolismo del HCB (23). Teniendo en cuenta que el HCB es un débil agonista de Ahr (aproximadamente 2200 veces menos potente que TCDD) (22) es posible pensar que solo algunos efectos tóxicos del HCB serían mediados por su interacción con Ahr.

Otros pesticidas provocan fenómenos de inducción actuando a través de otros mecanismos. Por ejemplo los proliferadores de peroxisomas actuando a través de sus propios receptores (PPARs) o, como mencionamos anteriormente, por el fenobarbital que parece no interactuar con receptor alguno.

A pesar de las diferencias en la causa del fenómeno de inducción existe siempre algo en común: las células desencadenan el fenómeno de inducción a expensas de otras actividades, algunas íntimamente

relacionadas con la nutrición. Las células afectadas por xenobióticos muestran cambios morfológicos, indicando un tremendo incremento en el retículo endoplasmático. Muchas veces los animales intoxicados crónicamente con pesticidas, y que presentan inducción sostenida de enzimas detoxificantes, desarrollan hígados grasos. Se ha propuesto que las actividades metabólicas incrementadas podrían afectar al metabolismo de los esteroides y otras hormonas y alterar otras vías del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.

Entre los tóxicos que actúan a través de Ahr las dioxinas son las que poseen mayor potencia de inducción de sistemas detoxificantes, pequeñas dosis del mismo podrían afectar el status nutricional de animales superiores. El mecanismo de acción del TCDD ha sido el más extensamente estudiado. Este pesticida produce diferentes síntomas de toxicidad según la especie animal de que se trate, su edad, cepa y sexo. Uno de los síntomas más comúnmente observados en la mayoría de las especies animales como resultado de la intoxicación con TCDD es la pérdida de peso que involucra mayormente la pérdida de grasa y músculo. Este fenómeno llamado “wasting síndrome” puede llevar al animal a la muerte (24).

## **6. Efecto del HCB sobre enzimas lipogénicas**

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio han indicado que el tratamiento de ratas Wistar con HCB (1g /kg peso corporal) incrementaba la actividad de enzimas citosólicas lipogénicas hormono-tiroideo dependientes en el hígado tales como las enzimas: málica (EM), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) y 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH), sin alteraciones en la actividad de la enzima mitocondrial gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GPD). La inducción en la actividad de estas enzimas causada por el pesticida se observaba solamente en presencia de hormonas tiroideas (25).

Se sabe también que el TCDD produce un incremento en la actividad de estas enzimas lipogénicas (26).

## **7. Función de la enzima málica dentro del metabolismo de los lípidos**

Para la síntesis y el alargamiento de los ácidos grasos intervienen sistemas enzimáticos mitocondriales y extramitocondriales que requieren NADPH.

Las reacciones de oxidación de la vía de las pentosas constituyen probablemente la fuente principal del hidrógeno requerido para la síntesis reductora de los ácidos grasos. Los tejidos que poseen esta vía tales como el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria de la mujer en la lactancia

realizan también una lipogénesis activa. Ambas vías metabólicas tienen lugar en la región extramitocondrial de la célula, de manera que no hay barreras de membranas ni de permeabilidad para la transferencia de NADPH/NADP de una vía a la otra. Otras importantes fuentes de NADPH incluyen la isocitrato deshidrogenasa extramitocondrial (que probablemente no constituya una fuente sustancial) y la reacción que convierte el malato a piruvato que es catalizada por la “enzima mágica” (EM). Fig. 2

La vía de las pentosas es una vía glucolítica, que ocurre en el citoplasma de los tejidos, antes mencionados y utiliza NADP y no NAD como receptor de hidrógeno. En este proceso intervienen las enzimas G-6PDH y 6-PGDH, dos enzimas que requieren NADP como cofactor, generándose como resultado NADPH.

Es probable que la presencia de lipogénesis activa o un sistema que utilice NADPH estimule una degradación activa de la glucosa por la vía de las pentosas.

Como se muestra en la figura 3 hay 3 fuentes principales de ingreso de ácidos grasos en el torrente sanguíneo. Uno son los quilomicrones resultantes de la digestión y absorción de los triglicéridos alimentarios, el otro a partir de síntesis de novo de los ácidos grasos (lipogénesis) en hígado y en tejido adiposo (27).

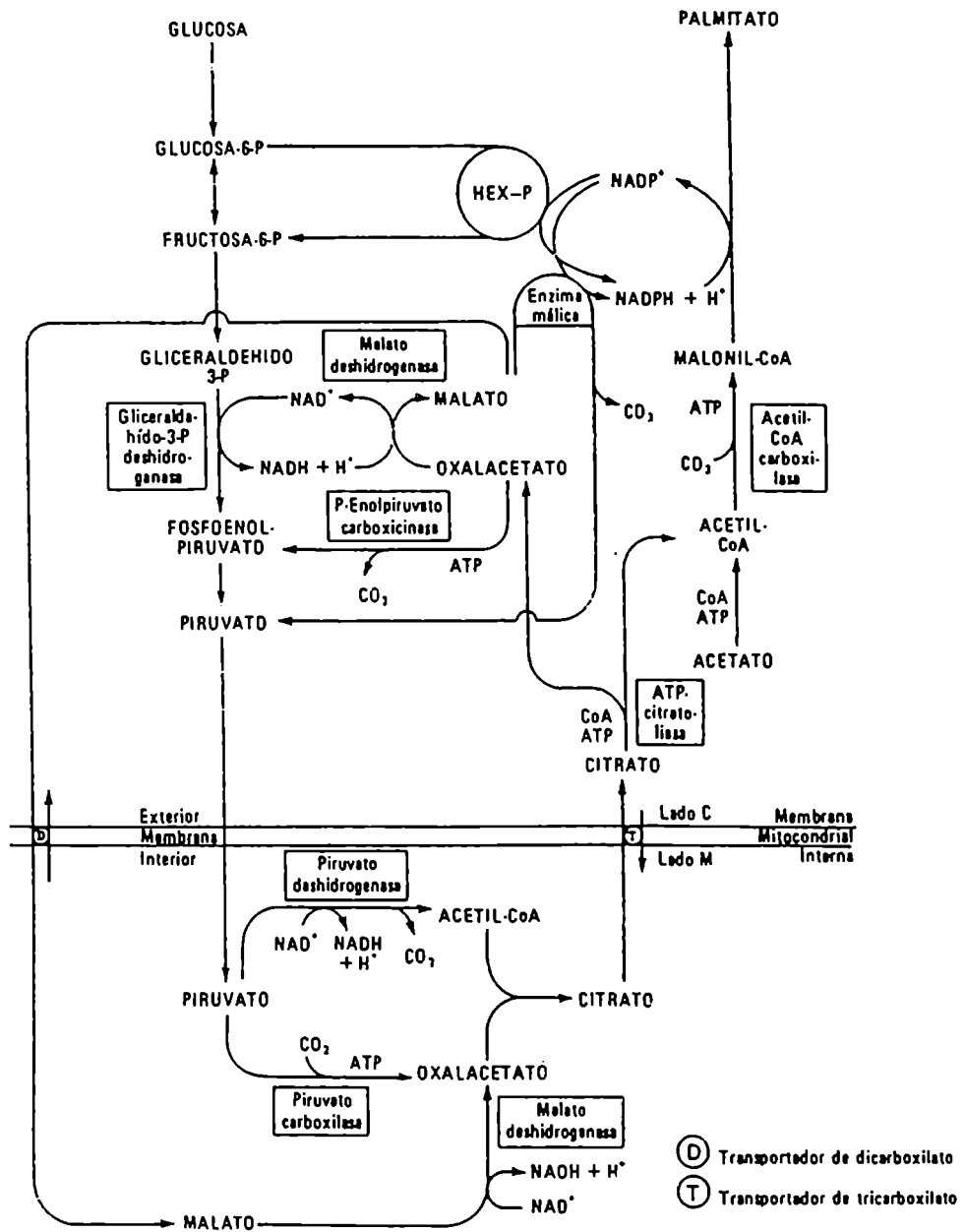


Fig. 2 Provisión de citrato y NADPH para la lipogénesis. (Hex-P=via de las pentosas)

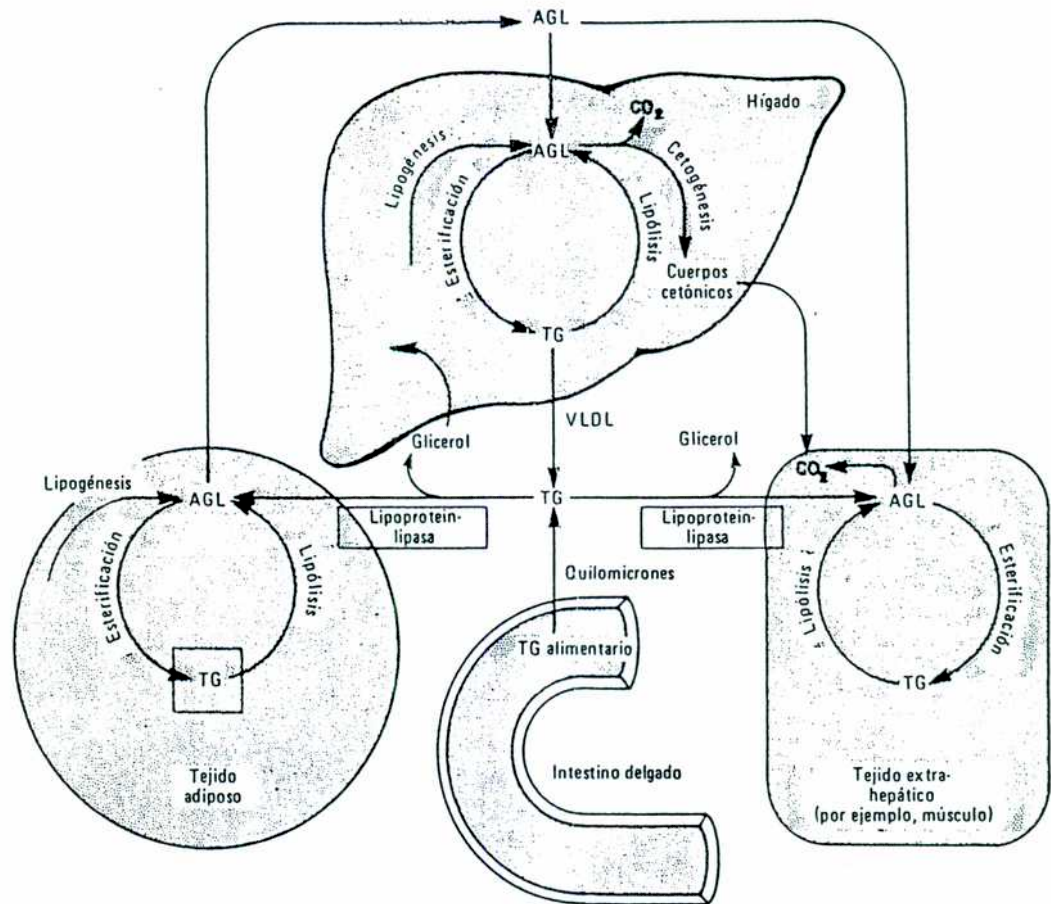


Fig. 3 Panorama general del metabolismo de los lípidos en el animal completo. VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; AGL, ácidos grasos libres; TG, triacilglicerol.

Dentro del tejido adiposo es importante diferenciar que existen el tejido adiposo blanco y el marrón (TAM). En las mitocondrias del TAM existe una proteína característica llamada “proteína desacoplante” encargada de desacoplar el proceso de formación de ATP del transporte de electrones, liberándose esa energía como calor y contribuyendo de esta manera en la regulación del balance térmico del organismo. Problemas en el funcionamiento del TAM han sido relacionados con obesidad (28).

Los ácidos grasos son el principal combustible para la termogénesis en el TAM. En este tejido la lipogénesis es muy activa y por lo tanto la actividad de enzimas lipogénicas como EM es muy alta. Incluso la actividad basal de EM es mucho más alta en TAM que en hígado pero su regulación es diferente (29). Por otro lado los ácidos grasos que serán utilizados en el TAM también pueden provenir de la dieta o ser importados de otros tejidos lipogénicos como el hígado.

## **8. La enzima málica un buen modelo para el estudio del mecanismo de acción del hexaclorobenceno**

### **8.1. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DE LA ENZIMA MÁLICA**

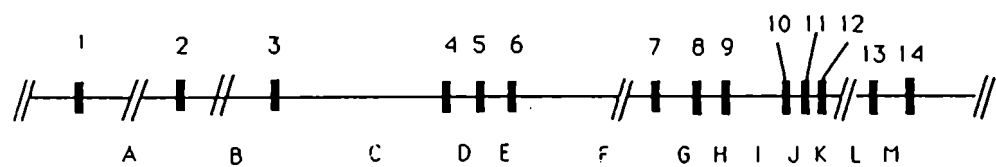
Como habíamos descrito anteriormente la enzima málica citosólica (L-malato-NAPDH-oxidoreductasa) cataliza la reacción de

descarboxilación oxidativa de malato a piruvato + CO<sub>2</sub>, utilizando como coenzima al NADP, que se transforma durante la reacción en NADPH+H; el poder reductor obtenido de esta manera será desviado mayoritariamente hacia rutas lipogénicas. La actividad de la enzima fue originalmente descrita por Ochoa y col. en hígado de paloma (30); siendo purificada posteriormente (31, 32). El peso molecular de la enzima es de 64.000 dalton y está formada por cuatro subunidades idénticas en rata, aunque parece ser bifuncional puesto que sólo 2 de ellas están sujetas a recambio (33). Sin embargo, estudios inmunológicos en ratón sugieren la formación del tetrámero a partir de 2 subunidades distintas (34). Su vida media es de aproximadamente 20 h. Aunque la estructura de la enzima no se conoce bien, disponemos de algunos datos procedentes del análisis de la secuencia de nucleótidos del gen para la enzima de rata (33). Según estos datos cada subunidad constaría de unos 585 aminoácidos (aa), con tres sitios potenciales de glicosilación que no parecen usarse y una región rica en cisteína (11 residuos consecutivos). Su configuración en el espacio, sería mayoritariamente en forma de  $\alpha$  hélice, con un pequeño componente en hoja plegada  $\beta$  en el sitio de unión de NADP.



## 8.2. EL GEN Y SU PROMOTOR

El clonado del gen que codifica para la enzima málica de rata (35), permitió su análisis estructural. Su longitud es superior a 100 Kb, contiene 14 exones, con algunos intrones de más de 15 Kb, cuyo significado es desconocido (36). Su estructura se indica en la figura 4. En el genoma de ratón el gen se ubica en el cromosoma 9, su localización en el genoma de rata o pollo no se conoce.

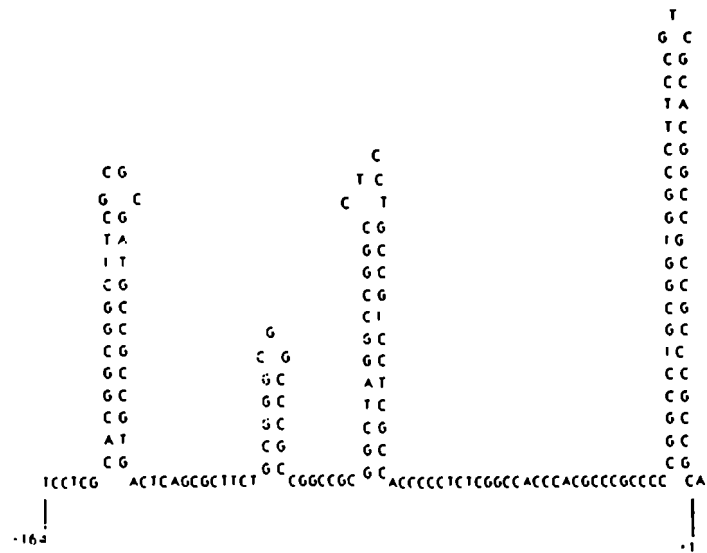


**Fig. 4 Estructura del gen que codifica para la enzima málica de rata.** Las barras negras indican la posición de los exones. Las letras indican los intrones cuyo tamaño se representa a escala. El tamaño de los exones varía desde 76 a 1513 pb.

La enorme longitud de la mayoría de sus intrones contrasta con el pequeño tamaño de los exones, y hace de este gen uno de los más grandes descritos hasta el momento. La relación entre el tamaño de la secuencia codificante y el gen entero es muy baja ( $-1/40$ ), en claro contraste con la relación obtenida para otros genes como el que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) ( $-1/2$ ). Su enorme longitud

puede justificar los largos tiempos requeridos para observar inducción de la transcripción.

**La región adyacente al extremo 5' (8) carece de secuencias TATA o CAAT en su porción proximal, aunque se la encuentra en posición -622. En posición -144 se encuentra una secuencia CCGAT, similar a la secuencia consenso CCAAT que asegura altos niveles de transcripción. Se encuentran varios sitios de inicio de la transcripción, el más frecuente de los cuales se localiza en posición -31 respecto al triplete ATG, que señala el sitio de "capping" del RNA transcrito. La ubicación de las secuencias TATA y CAAT tan alejadas del triplete ATG, son características de genes constitutivos y oncogenes (en genes más específicos se encuentran alrededor de las posiciones -20 y -80 respectivamente). La sustitución de una base en la secuencia CCAAT podría explicar, al menos en parte, los bajos niveles de expresión del gen en la mayoría de los tejidos. Por otra parte, la región 5' proximal es rica en nucleótidos de citosina y guanina, el hexanucleótido CCGCCC se repite 9 veces con 65,63,61...nucleótidos de separación entre uno y otro, de manera que se puede predecir una estructura secundaria en la que se formen 4 bucles potenciales que pueden ser importantes para el inicio de la transcripción. Fig. 5**



**Fig. 5 Estructura hipotética de la región 5'proximal del gen de EM.** Estas 4 configuraciones potenciales se han deducido usando un programa de computación.

De los 9600 pb adyacentes al extremo 5' del gen que se han analizado (37), sólo las 177 inmediatamente anteriores son fundamentales para la actividad máxima del promotor (38). En esta región se detectan 4 secuencias de unión a proteínas que podrían ser importantes en la regulación del gen (39) (ver Fig 6, panel A). Además, se han descrito 3 secuencias (elementos en cis) reconocidas por proteínas reguladoras de la transcripción (factores en trans):

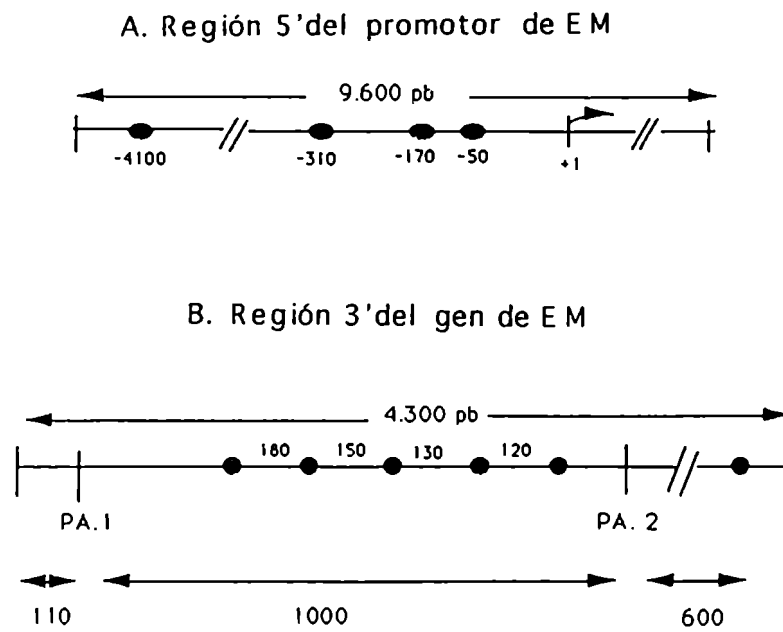
a) un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (**TRE**), situado en posición -281/-261 (40).

b) una secuencia **API** reconocida por proteínas Jun/Fos, en posición -132/-126 (38).

c) un elemento de respuesta al receptor de factores de proliferación de peroxisomas (**PPRE**) en posición -338/-326 (41).

Las secuencias mencionadas anteriormente han sido caracterizadas estructural y funcionalmente. Mediante el uso de programas de computación se han detectado también dos secuencias de alta homología con los elementos de respuesta a Insulina (IRE) en las posiciones -622/-678 y entre -175 a -156 (42). Dentro de esta última ha sido descrita una secuencia para unión del factor de transcripción Sp1 y se ha postulado que la acción de Insulina podría ser mediada por Sp1, aunque no se ha comprobado aún con certeza que las secuencias IRE y Sp1 sean funcionales dentro de este promotor.

En el extremo 3' del exon 14 se encuentran 2 sitios principales de poliadenilación, de cuyo uso alternativo resultan 2 RNAs de  $3100 \pm 50$  y  $2250 \pm 50$  nucleótidos respectivamente. Estos 2 RNAs difieren únicamente en sus regiones 3' no traducidas de 345 y 1345 nucleótidos respectivamente, conteniendo ambos la información necesaria para la proteína completa (39). Entre los sitios de poliadenilación, se localizan 5 secuencias de unión a proteínas, periódicamente colocadas, separadas entre sí por 150 pb aproximadamente. Además existe otro sitio adicional, 600 pb más allá del segundo sitio de poliadenilación que puede estar involucrado en la terminación de la transcripción.



**Fig. 6** Esquema de las secuencias protegidas por proteínas en las regiones adyacentes 5'y 3'del gen de EM (indicadas con círculos negros). Los números indican las posiciones de estas secuencias respecto al sitio de inicio de la transcripción en el panel A, y la separación entre ellas en el panel B, expresadas en pb. PA. 1 y 2 indican los sitios de poliadenilación.

## **9. Hormonas y factores que regulan la expresión del gen de EM**

### **9.A. Reguladores positivos**

#### **9.A.1.1. HORMONAS TIROIDEAS- MECANISMO MOLECULAR**

##### **DE ACCION**

Los efectos de las hormonas secretadas por la glándula tiroides son generalizados pudiendo actuar sobre el crecimiento, la diferenciación celular, termogénesis y el metabolismo. Teniendo en cuenta que el de la EM es un gen eminentemente metabólico, no llama la atención que sean las HT las principales reguladoras de la expresión del mismo.

La principal hormona secretada por la tiroides es la  $T_4$  (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina), pero también secreta en una menor cantidad la 3,5,3'-L-triiodotironina o  $T_3$ ; siendo ésta última la forma activa de las hormonas tiroideas en los tejidos diana. La mayor parte de la  $T_3$  circulante es generada en tejidos periféricos por deiodinación de  $T_4$ .

Las hormonas tiroideas viajan en la circulación unidas a proteínas plasmáticas y logran el acceso a la célula por mecanismos que pueden involucrar proteínas específicas de transporte a través de membrana.

Se ha demostrado que la acción de las HT es ejercida a través de su unión a receptores nucleares específicos ( $RT_3$ ).

Los receptores de  $T_3$  son proteínas nucleares monoméricas de estructura similar a receptores de otras hormonas hidrofóbicas, como los esteroides adrenales y gonadales, la vitamina  $D_3$ , los retinoides y también factores de transcripción de estructura similar, que no poseen ligando reconocido, por lo que se han denominado “receptores huérfanos”, englobándose dentro de un grupo concebido como una superfamilia de receptores nucleares. Todos ellos son, en realidad factores de transcripción dependientes de ligando, de forma que la actividad de los mismos es regulable en mayor o menor medida por la unión del ligando específico, aunque en muchos casos se ha demostrado actividad transcripcional en su ausencia.

La estructura de todos estos receptores es muy similar, distinguiéndose varios dominios funcionales, de los que los más importantes y conservados son un dominio de unión al DNA y otro de unión al ligando.

La región de unión al DNA adopta una estructura de “dedos de zinc”. La secuencia de nucleótidos reconocida por el dominio de unión al DNA del receptor (elemento de respuesta a HT (TRE)) consiste en una repetición de la secuencia AGGTCA con una separación de cuatro nucleótidos. Estos medios sitios se pueden presentar como repeticiones directas (AGGTCA<sup>n</sup>AGGTCA) o palíndromes

(AGGTCA<sup>n</sup>TGACCT) o palíndromes invertidos (TGACCT<sup>n</sup>AGGTCA), estando espaciados por un número “n” de nucleótidos. Hay un óptimo binding de RT<sub>3</sub> a repeticiones directas cuando los medios sitios se encuentran separados por cuatro nucleótidos (DR-4).

Esta secuencia TRE, es análoga a las secuencias de reconocimiento de otros receptores nucleares, como los de ácido retinoico (RARE) o vitamina D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>RE), con la diferencia de que en las dos últimas las repeticiones están separadas por cinco o tres nucleótidos. La mayoría de los genes diana estudiados poseen, no obstante, variaciones de esta secuencia consenso.

La similitud entre los receptores de T<sub>3</sub> y los de ácido retinoico o vitamina D<sub>3</sub> no se limita sólo a que reconocen secuencias muy parecidas en el DNA, sino a que se unen a estos sitios de reconocimiento en forma de heterodímeros con un receptor denominado RXR (originalmente receptor de retinoide “X”), identificado como el receptor del ácido 9-cis retinoico. Este compuesto puede originarse en el organismo tras isomerización del ácido retinoico (todo-trans). La unión de los heterodímeros es tal que RXR se une siempre al sitio distal y RT<sub>3</sub> al proximal, en relación con el inicio de la transcripción. La unión del heterodímero RXR-RT<sub>3</sub> al TRE hace que se activen otros factores de transcripción, modulando así la transcripción del gen diana (activación o represión).



Hasta la fecha se han caracterizado varias formas moleculares del  $RT_3$  que son productos de dos genes distintos, denominados  $\alpha$  y  $\beta$ . El gen  $\alpha$ , a su vez, produce tres formas moleculares denominadas  $RT_3 \alpha-1$ ,  $RT_3 \alpha-2$  y Rev-erbA. De estas, solo  $RT_3 \alpha-1$ , es un auténtico receptor de  $T_3$  pues es la única forma capaz de unir la hormona y ser activada por la misma.

El gen  $\beta$  produce dos isoformas que actúan como  $RT_3$ , denominadas TRB1 y TRB2, cuya estructura es idéntica con la excepción del extremo amino terminal. En hígado se expresa fundamentalmente TRB1, TRB2 posee una expresión muy limitada en la rata, detectándose únicamente en adenohipófisis y en determinadas áreas del sistema nervioso central, como el hipotálamo, durante el desarrollo.

Se ha descrito que  $RT_3$  interactúa *in vitro* con varios componentes proteicos del aparato transcripcional basal.  $RT_3$  interactúa con los factores de transcripción (TF) TFIIB, TFIID y la subunidad pequeña de TFIIE. La interacción  $RT_3$ /TFIIB ha sido profundamente investigada. Se ha propuesto como modelo que  $RT_3$  "per se" no podría interactuar con TFIIB y en estas condiciones la transcripción se encontraría reprimida, esta situación sería revertida por la llegada del ligando.

Es posible que el  $RT_3$  pueda también contactar con otros factores de transcripción generales y/o proteínas coactivadoras. Los coactivadores

conectan factores de transcripción situados río arriba en el promotor, tales como  $RT_3$ , a factores de transcripción generales tales como TFIIB (43)

Existen también otras formas menos iodadas de la hormona como producto de la deiodinación de la  $T_3$  y la  $T_4$ . También se encontraron HT sulfoconjugadas y glucuronoconjugadas en plasma y en orina.

De lo anteriormente expuesto se deduce que el status tiroideo de un individuo depende no sólo de la producción glandular de  $T_4$  y  $T_3$ , sino también de las transformaciones metabólicas de la hormona en los distintos tejidos.

El hígado es el principal órgano del metabolismo de HT en vertebrados. Ha sido descrito que en humanos aproximadamente el 30% del "pool" de  $T_4$  extratiroideo está en el hígado.

El 98% de la  $T_4$  que entra al hígado retorna a la circulación no metabolizada, el 2% residual es metabolizado a  $T_3$  y ésta fracción es una importante fuente de  $T_3$  circulante ya que esta hormona rápidamente deja el hígado. Este órgano es responsable de un 40% de la deiodinación de la  $T_4$  en el organismo. Existen iodotironina deiodinasas tejido-específicas que producen una fracción sustancial de la  $T_3$  unida a receptores nucleares en pituitaria, cerebro, hígado y tejido adiposo marrón.

Se ha comprobado que de la  $T_3$  unida a receptores en el hígado, solamente alrededor de un 25% proviene de la deiodinación basal de  $T_4$  y el restante 75% proviene de la  $T_3$  plasmática.

Aproximadamente un 70% de la  $T_4$  secretada diariamente es deiodinada para dar iguales cantidades de  $T_3$  y  $T_3$  reversa ( $rT_3$  o 3, 3', 5' triiodotironina). Entre un 70% y un 90% de la  $T_3$  circulante se origina por deiodinación extratiroidea de  $T_4$  y el resto deriva de la tiroides.

La remoción del átomo de iodo 5' del anillo fenólico es designado 5' deiodinación y la enzima que cataliza esa reacción es la 5' deiodinasa (5'D).

Existen dos isotipos de 5'D la tipo I (5'D I) y la tipo II (5'D II), con localización en tejidos diferentes.

El sustrato de preferencia de la 5'D I para la deiodinación es la  $rT_3$ , luego le sigue la  $T_4$  y por último  $T_3$ . Se ha determinado que ésta enzima juega un importante rol en la producción de la hormona activa ( $T_3$ ).

Esta isoforma se localiza en algunos tejidos como tiroides, riñón e hígado.

La 5'D II prefiere como sustrato a la  $T_4$  frente a  $rT_3$ . También difiere de la 5'D tipo I en cuanto a su distribución: se la encuentra en el sistema nervioso central, pituitaria y tejido adiposo marrón. En cuanto a su localización subcelular ambas se localizan en membranas del retículo endoplasmático.

La remoción del átomo de yodo 5-(o 3-)del anillo de tirosilo es designado 5-deiodinación y la enzima que cataliza esta reacción es la 5-deiodinasa (5 D).

La deiodinación de las iodotironinas en las posiciones 5- o 3- del anillo tirosilo es una de las rutas más importantes de degradación de  $T_3$  e inactivación de  $T_4$  (para dar  $rT_3$ ). Esta reacción es clave para reciclar el yodo. Debido a que se produce  $rT_3$ , el sustrato competitivo para la 5' deiodinación, esto puede ser un importante camino de regulación del metabolismo de las hormonas tiroideas y su acción. La reacción de 5-deiodinación ocurre en casi todos los tejidos excepto en la pituitaria anterior. Altos niveles de ésta enzima están presentes en el retículo endoplasmático de tejidos como cerebro y placenta alcanzando su máximo nivel en el hígado. Algunos autores han propuesto que la 5'- y 5 deiodinación son catalizadas por una única enzima en éste órgano (44).

#### **9.A.1.2. EFECTO DE LAS HT SOBRE LA EXPRESION DE GENES HEPATICOS**

Se han descrito numerosos efectos de las HT ejercidos a nivel transcripcional sobre genes específicos (EM, Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH), PEPCK, subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tirotrófina (TSH)), así como de estabilización de los RNAs de Spot 14 y EM (45,

46). *In vivo*, se observa un aumento en los niveles de actividad de EM en hígado de ratas hipertiroideas y disminución en ratas hipotiroideas. Este aumento se alcanza por un incremento de 2-4 veces en la tasa de transcripción y el resto por estabilización de los transcritos primarios a nivel nuclear (47). Los dos RNAs se inducen igualmente por  $T_3$  en hígado, aunque difieren en la cinética de inducción (48, 49), donde la acción de la hormona está mediada por las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor. En corazón y riñón, los niveles de los RNAs específicos aumentan en menor proporción (3-4 veces) y en otros tejidos, que no disponen de receptores para la hormona, como testículo y bazo, no se observa inducción (48). Pese a que en hígado de rata los niveles de receptor de HT no varían con la edad, la capacidad de respuesta hormonal disminuye (50, 51). Además la respuesta a HT se amplifica en presencia de insulina (52, 53), glucocorticoides (54) y glúcidos de la dieta (51, 55, 56); inhibiéndose por aumentos en la concentración de AMPc (53). Como conclusión, las HT son los más activos inductores de la actividad de la EM, y actúan primariamente aumentando la tasa de transcripción y en mayor medida estabilizando los transcritos nucleares, estando la respuesta modulada por otras hormonas.

### **9.A.2. ESTABILIZACIÓN DE LOS MENSAJEROS: HIDRATOS DE CARBONO**

Se ha demostrado que en ratas, el ayuno prolongado produce una disminución en la síntesis de EM, siendo aumentada por el contrario por la realimentación. Es así que los glúcidos constituyen el más potente inductor nutricional y su efecto se ejerce exclusivamente en el hígado (57, 50). Los glúcidos favorecen la lipogénesis en general y actúan independientemente de las HT (58). Con dieta rica en glúcidos y pobre en grasas, se observa un gran aumento tanto en la actividad (58, 59), como en los niveles de RNAm de EM (58) este efecto es debido principalmente a la estabilización del RNAm citoplasmático (57, 58) puesto que la tasa de transcripción aumenta muy poco (58). Los glúcidos capaces de inducir son aquellos que entran a la célula y se metabolizan siendo su fosforilación un prerrequisito necesario pero no suficiente (60). La respuesta de la EM a los hidratos de carbono disminuye también con la edad (51) y su efecto depende de la presencia de insulina, que hace posible su metabolización.

### **9.A.3. INSULINA-¿UN EFECTO SECUNDARIO?**

La tasa de liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo es afectada por muchas hormonas que influyen sobre la esterificación o la hidrólisis de los mismos. La administración de insulina produce una

disminución de los ácidos grasos libres plasmáticos circulantes. *In vitro*, inhibe la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo, refuerza la lipogénesis y la síntesis de acilglicerol y aumenta la oxidación de la glucosa a CO<sub>2</sub> por la vía de las pentosas. Otros autores demostraron que la hormona por sí sola carece de efecto, pero que actúa junto con T<sub>3</sub> aumentando sensiblemente la inducción producida por ésta última (52, 53, 54); en algunos trabajos se ha señalado que éste es un efecto general sobre la síntesis proteica y no específico sobre la EM (52). En el extremo opuesto se encuentran aquellos trabajos que describen una acción de insulina “per se”, en ausencia de T<sub>3</sub> incrementando hasta 120% la síntesis de EM en adipocitos marrones procedentes de fetos de rata (61) o 200% en hepatocitos de rata en cultivo (62). Algunos autores describen que la insulina induce un aumento específico en la transcripción del gen de la EM de 2,8 veces, debido a su contribución (directa o indirecta) a la estabilización de los RNAm (63).

#### **9.A.4. PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS**

En las últimas décadas se han realizado considerables esfuerzos para tratar de entender como determinadas sustancias químicas inducen la proliferación de peroxisomas y hepatocarcinogénesis en roedores. Estos compuestos llamados proliferadores de peroxisomas no presentan

similaridad estructural a no ser por la presencia de un anillo aromático, ácido carboxílico y cadena alifática. Ejemplos de estos compuestos son las drogas hipolipidémicas, tales como el clofibrato, ampliamente usadas para prevención de enfermedades coronarias en Estados Unidos y Europa; algunos herbicidas y ciertos hidrocarburos clorinados. La administración de proliferadores de peroxisomas provoca una respuesta típica la cual es específica del tejido y parece afectar principalmente al hígado. Después de un corto tratamiento con proliferadores de peroxisomas las ratas exhiben hepatomegalia debida a una hipertrofia e hiperplasia del mismo. Los hepatocitos muestran una marcada proliferación de peroxisomas y en algunos casos mayor cantidad de retículo endoplasmático liso. Junto con el aumento en el número y tamaño de los peroxisomas, hay una inducción transcripcional de enzimas responsables de la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos, como la acil-coA oxidasa (AcoA) y otras localizadas en la matriz de los peroxisomas, las enzimas del CYP4A ubicadas en el retículo endoplasmático y la enzima citosólica hepática ligadora de ácidos grasos (L-FABP). Estas alteraciones morfológicas y cambios bioquímicos inducidas por los proliferadores de peroxisomas están asociados con alteraciones en el metabolismo hepático de los lípidos, como se refleja en la acumulación de triglicérido y colesterol en animales tratados. Bajo circunstancias normales la  $\beta$  oxidación en peroxisomas es solo un camino



secundario para la oxidación de ácidos grasos con respecto al sistema mitocondrial. Las enzimas de peroxisomas comienzan a estar comprometidas cuando el animal está bajo una crisis de sobrecarga de lípidos como las que provocan los proliferadores de peroxisomas, dietas ricas en grasas y desbalances metabólicos. La inducción coordinada de enzimas metabolizadoras de lípidos y la proliferación hepática es una respuesta adaptativa que mantiene la homeostasis de los lípidos celulares. Todos estos datos muestran que el rol central de la proliferación de peroxisomas es la regulación del metabolismo de los ácidos grasos. Un incremento en los ácidos grasos circulantes provenientes de la dieta o por disfunciones metabólicas, estimula la  $\beta$  oxidación peroxisomal y la  $\omega$  oxidación de los ácidos grasos en hígado. En última instancia esto resulta en la proliferación peroxisomal.

Los proliferadores de peroxisomas ejercen su acción a través de su receptor activado (PPAR). Se han identificado PPREs en los promotores de AcoA peroxisomal, tiolasa, CYP4A y la proteína ligadora de ácidos grasos (L-FABP) citosólica. Existen tres isoformas de PPARs la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de las cuales la  $\alpha$  es la más importante en hígado. La activación de genes por PPAR $\alpha$  es mediante su dimerización con el receptor del ácido retinoico X. Estudios realizados utilizando ratones “knock out” de PPAR $\alpha$

demonstraron que en estos no se inducía respuesta frente a proliferadores de peroxisomas como clofibrato o el detergente Wy-14,643 , es decir no presentaban hepatomegalia, proliferación de peroxisomas en la célula, ni inducción de los RNAm que codifican para enzimas de peroxisomas y microsomas del metabolismo de lípidos (64). Es decir que PPAR $\alpha$  es la principal isoforma requerida para mediar la respuesta pleiotrópica que ocurre como resultado de la estimulación con proliferadores de peroxisomas en roedores. Otras isoformas de PPARs no serían importantes en el hígado.

Se ha demostrado que los proliferadores de peroxisomas inducen en ratas eutiroideas e hipotiroideas, la actividad de enzimas clasificadas como hormono-tiroideo dependientes tales como la EM,  $\alpha$ -GPD mitocondrial, glucosa 6 fosfatasa y Spot 14.

Como las hormonas tiroideas y el PPAR juegan un importante rol en el metabolismo de los lípidos, el camino de señales de transducción por el que actúan podrían estar acoplados. Ha sido demostrado que PPAR puede heterodimerizar con RT<sub>3</sub>. El PPAR puede influenciar positivamente o negativamente la acción de HT dependiendo de la estructura del TRE y el isotipo de RT<sub>3</sub> con que forma el heterodímero. El heterodímero RT<sub>3</sub> $\alpha$ -PPAR tiene un efecto positivo sobre la transcripción de algunos genes pero su interacción con el DNA no es através de un clásico elemento de

respuesta a HT (TRE) caracterizado como un DR4 sino a través de un nuevo TRE (DR2) (65). El dímero  $RT_3\alpha$ -PPAR tiene un efecto negativo sobre la transcripción. Además se ha demostrado la unión preferencial de PPAR $\alpha$  con RXR $\alpha$  más que con  $RT_3$ .

Se ha demostrado que los proliferadores de peroxisomas ejercen un efecto tiromimético induciendo activación transcripcional del gen de la EM y éste efecto es mediado por la unión del dímero PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  a un “enhancer” ubicado en la región 5' flanqueante del promotor de EM, el cual es diferente del TRE de dicho promotor (66). Esta secuencia es semejante a los PPREs encontrados en otros genes cuya transcripción es regulada por PPAR.

## **9.B. Reguladores negativos**

### **9.B.1. INHIBICIÓN POR INDUCTORES DE AMPC**

El glucagon y la norepinefrina (NE), actuando vía receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos respectivamente inducen aumentos en el AMPc intracelular (52, 67, 68) induciendo lipólisis y gluconeogénesis, e inhibiendo la glucólisis y la lipogénesis. En hígado de rata, las situaciones que conducen a aumentos en la concentración de glucagon en plasma (diabetes y ayuno) se

traducen en el aumento de la síntesis de AMPc intracelular pudiendo traducirse en modificaciones de determinados factores de transcripción como la proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB), que se une a elementos de respuesta a AMPc (CREs) en el DNA, modificando la tasa de transcripción de algunos genes (69). En el promotor del gen de la EM no se ha descrito ninguna de estas secuencias (37); pero es posible que el AMPc ejerza su acción indirectamente. Puede actuar también a nivel citoplasmático modificando la estabilidad de los transcriptos o de la proteína en sí; y es posible que en distintos tipos celulares el nivel de actuación sea distinto. Utilizando hepatocitos de rata en cultivo, ni el glucagon ni la NE son capaces de inhibir la síntesis de EM por sí mismas, su efecto consiste en disminuir la inducción causada por otros agentes como los glúcidos (60) y principalmente la debida a  $T_3$  o  $T_3$ +insulina (52, 53, 62). El mismo resultado se obtiene tras el tratamiento con agentes artificiales, como forskolina, dibutiril-AMPc, 8 Br-AMPc y teofilina. Los aumentos de AMPc intracelular, aparentemente afectan en forma diferente la síntesis de EM según los sistemas involucrados.

### **9.B.2. EL ACIDO RETINOICO ES TAMBIEN UN INHIBIDOR**

El ácido retinoico (AR), metabolito activo de la vitamina A, ejerce profundos efectos sobre la diferenciación y homeostasis de la mayoría de

los tejidos (70,71). Estos efectos están mediados por receptores nucleares específicos (RARs) de la superfamilia de los receptores de hormonas tiroideas-esteroideas (72) que, reconocen secuencias específicas (RAREs) en los promotores de algunos genes, activando o inhibiendo su transcripción (73). En otros casos, sus efectos se ejercen a través de TREs como en el caso del promotor de la hormona de crecimiento (GH) (74). Otras veces el mecanismo es independiente de su unión al DNA. Los efectos inhibitorios suelen estar mediados por interacciones entre RARs y otros factores de transcripción, ya sea compitiendo por el sitio de unión al DNA o bien secuestrándolo e impidiendo su unión (73). Puesto que AR y  $T_3$  ejercen a veces sus efectos transcripcionales a través del mismo elemento (TRE), muchos genes diana para  $T_3$  lo son también para AR, ejerciendo el mismo efecto o un efecto opuesto; ya que la  $T_3$  es el principal inductor de EM este gen es un posible candidato para la regulación por AR. Recientemente se ha caracterizado un RARE en el promotor del gen de otra enzima metabólica (PEPCK) <sup>1001</sup> (75), lo cual sugiere que los efectos del AR son aún más generalizados de lo que se creía, regulando no solo genes de factores de transcripción, hormonales y de receptores de membrana, sino también genes metabólicos.

### 9.C. Otros reguladores

A parte de los inductores e inhibidores ya mencionados, existen otra serie de sustancias menos estudiadas, capaces de alterar la actividad de la EM o la concentración de los RNAs correspondientes. En hepatocitos de rata en cultivo, los **glucocorticoides** como el cortisol o dexametasona (incapaces de modificar la expresión del gen por sí mismos) son necesarios para alcanzar la máxima respuesta (54). La **hormona tirotrópica**, sin alterar la tasa de transcripción, induce también aumentos en los niveles de los RNAs de EM en células de tiroides en cultivo FRTL-5. El esteroide adrenal **dehidroepiandrosterona**, que inhibe la lipogénesis en general y se considera una hormona antiobesidad, curiosamente también induce aumentos en la transcripción del gen de EM, específicamente en hígado (76), aunque en tejido adiposo no se ha estudiado su efecto. Una **alimentación rica en grasa** y pobre en hidratos de carbono, conduce a disminuciones tanto en la actividad de la enzima como de los niveles de sus RNAs, disminuyendo la vida media de estos sin afectar la tasa de transcripción (58). Los aumentos en la glucólisis conducen también a aumentos en EM, pero no cualquier intermediario glucolítico es capaz de imitar este efecto. Se ha sugerido que la **piruvato deshidrogenasa mitocondrial** induce la actividad de EM incluso en ausencia de insulina o

en presencia de glucagon, mientras que ningún otro intermediario glucolítico es capaz de hacerlo en estas condiciones (60).

# **MATERIALES Y METODOS**



### **1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar, con un peso inicial de 160-180 g

### **2. Cultivos celulares**

En éste trabajo se usaron dos tipos de cultivos celulares:

- a) La línea de hepatoma de rata H-35 (H-4-H-E, que se adquirió en “American Type Culture Colection” (ATCC#CRL-1548).
- b) La línea de hepatoma humano HepG2 (ATCC#HB 8065).

### **3. Productos utilizados**

El HCB utilizado para el drogado de los animales (90% de pureza) fue donado por Cabeza S.C.A., Argentina. El HCB utilizado en los experimentos con células (99% de pureza) fue comprado a SIGMA Co., Inc. (producto N°17105-0). Los reactivos utilizados fueron suministrados por Merck, Sigmay Serva. Enzimas de restricción de Boehringer Mannheim y Pharmacia. Productos radioactivos,  $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol) para marcación de sondas usadas en ensayos de protección a RNasa,  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCT para el marcaje de cDNAs usados en experimentos de northern-blot y  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP para el marcaje de oligonucleótidos usados en los ensayos de retardo en gel. D-threo-(dichloroacetyl-1-14-C) Chloramphenicol

(57mCi/mmol), de Amersham Radiochemical.  $^{125}$  I 3,5,3'- triiodotironina actividad específica (1200  $\mu$ Ci/ $\mu$ g), concentración 320  $\mu$ Ci/ml, de New England Nuclear.

Enzimas y productos utilizados para marcar radioactivamente las sondas de cDNA provenían de Pharmacia ("oligolabeling reaction kit"), o de BRL (Bethesda Research Laboratory, "Nick translation kit"). Medio de cultivo (DEMEM) y sueros de Gibco. Oligo (dt)-celulosa (mRNA separator kit) de Clontech. Membranas de Nytran y nitrocelulosa, de Schleider & Schuell. Acrilamida /bis acrilamida, de BIO-RAD. Placas de cromatografía en capa delgada (sílica gel IB2,20X20 cm), J.T.Baker Inc. Películas autorradiográficas, Kodak o Valca. Anticuerpos anti c-Fos (4)-G: Cat # sc-52 de Santa Cruz Biotechnology (rabbit polyclonal IgG, epitope correspondiente con los aminoácidos 3-16 mapeados desde el extremo aminoterminal de c-fos. Reactivo con la proteína de humanos, ratón y rata). Anti c-Jun (11-79) Cat # 1694 Santa Cruz Biotechnology (rabbit polyclonal IgG, epitope correspondiente con los aminoácidos 1-79 mapeados desde el extremo aminoterminal de c-Jun. Reactivo con la proteína de humanos, ratón y rata). Kit de Protección a RNasa de Ambion (Ambion RPAII Ribonuclease protection assay kit). Kit de Enhanced chemiluminiscence (ECL) de Amersham.

**4. Plásmidos utilizados para la obtención de cDNAs**

**A)** pME B (77), contiene el inserto de cDNA total para el gen de EM de rata, originalmente clonado por Magnuson y col. (35) y subclonado en el vector pUC 19, entre los sitios de corte para las enzimas de restricción Bgl II y Bam III. Debido a la presencia de un sitio interno de corte para la enzima Bam III, la digestión del DNA plasmídico con éstas enzimas rinde 2 fragmentos de DNA de 1,627 y 1,25 kb.

**B)** GAPDH cDNA: inserto de 1,1 kb subclonado en 1 sitio PstI de PGEM (78)

**C)** PEPCK cDNA: fragmento de 1,5 kb subclonado en un sitio PstI de pPCK10 (79)

**D)**  $\alpha$ -GPD cDNA: Inserto de 2.3 kb subclonado en un sitio ECO RI de pBluescriptIIISK+ (80)

**E)** 28S cDNA: Inserto de 28S subclonado en PBR 322.

**F)** p $\beta$ -actina: contiene el cDNA del gen  $\beta$ -actina de rata (de 0,685 kb), subclonado en PUC 19, entre los sitios de corte para las enzimas de restricción Eco RI y Hind III (78)

**G)** IINF-3 cDNA: inserto de 2,2 kb subclonado en el sitio ECO RI del polinker de pBluescriptIIISK+

**5. Plásmidos utilizados para transfecciones**

**A)** pUC CAT (37, 81) es un plásmido derivado de pUC que contiene la secuencia codificante del gen bacteriano: cloranfenicol acetil transferasa.

**B)** pME 882-CAT (37, 81), contiene los 882 pb inmediatamente anteriores al sitio de inicio de la transcripción, este fragmento se obtiene por digestión del promotor del gen de EM (con ECO RI en el extremo 5' y con Hind III en el extremo 3') y se subclonó en pUC CAT.

**C)** pME 177-CAT (37, 81), contiene los 177 pb del promotor del gen de ME, inmediatamente anteriores al sitio de inicio de la transcripción y se obtuvo por deleción del extremo 5', a partir del anterior (usando la enzima de restricción Sca I). Este fragmento se subclonó igualmente en pUC CAT.

**D)** pRSV-I.LUC (82), contiene un fragmento del promotor del virus de Sarcoma de Rous ligado a la secuencia codificante del gen de luciferasa de insectos, clonada en un plásmido derivado de PUC.

**E)** pRSV-CAT (83), contiene un fragmento del promotor del virus de Sarcoma de Rous ligado al gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

**6. Plásmido utilizado para la obtención de la ribosonda de TRB1 usada en los ensayos de protección a RNasa.**

Para la síntesis de la ribosonda complementaria al RNAm de TRB1 se utilizó como molde un cDNA de 237 pb subclonado en un sitio Kpn I/ Pst

I del plásmido pBSSK+ en posición 3'-5' del promotor de la polimerasa T7 (84). Dicha enzima se utilizará luego para la síntesis de la ribosonda.

**7. Medios instrumentales.**

- Microfuga Beckman y Biofuga Heraeus.
- Centrífugas Sorvall RC5 o Beckman J2-21M/E. Ultracentrifugas Beckman, modelos L8-70R y L8-M.
- Contador Beta de centelleo Intertechnique, modelo LKB 1219.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.
- Procesador de autorradiografías Kodak.
- Densitómetro Scanner GS. Hoefer Scientific Instruments.
- Luminómetro Biolumat de Berthold.
- Stratagene Linker

**1. La rata como modelo experimental para el análisis de la expresión del gen de EM por HCB.**

**1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

**1.1.a. Animales**

Se utilizaron ratas Wistar cuyo peso fue de 160-180 g al comienzo del experimento las cuales fueron alimentadas **ad libitum** con dieta Purina 3 y agua. Las condiciones ambientales consistieron en ciclos de 12 h de luz-12 h de oscuridad, 20-24 °C y 45-75% de humedad.

**1.1.b. Tratamiento de los animales.**

Una dosis de HCB de 1 g/kg de peso corporal fue administrada diariamente a los animales por intubación gástrica durante 9 y 15 días. El fungicida (40 mg/ml) fue disuelto en agua conteniendo Tween 20 (0.5 ml/100ml). Los animales controles fueron tratados con Tween 20 en algunos experimentos, al no observarse cambios en el resto de los experimentos se utilizaron controles normales. Los animales fueron sacrificados por decapitación.

### **1.1.c. Procesamiento de las muestras.**

Los hígados de rata fueron perfundidos para eliminar restos de sangre. Posteriormente fueron extraídos y cortados en pequeños trozos los cuales fueron congelados inmediatamente en Nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta tanto las muestras fueron procesadas.

### **2. Determinación de la concentración de $T_4$ y $T_3$**

$T_4$  y  $T_3$  fueron medidas en plasma y en hígado por Radio Inmuno Ensayo (RIA). Este método altamente sensible y específico fue previamente descrito por Morreale de Escobar y col. (85).

### **3. Determinación de la actividad 5' deiodinasa y 5 deiodinasa**

La actividad de la 5' deiodinasa y 5 deiodinasa fue ensayada en homogenatos de hígado como fue descrito por Ruiz de Oña y col. (86).

### **4. Análisis de Scatchard**

Se prepararon núcleos de hígado según la técnica descrita por Bernal y col. (87) con modificaciones. Los animales fueron sacrificados por decapitación y los hígados fueron perfundidos antes de su extracción y posteriormente homogeneizados en SM (sacarosa 0,32 M -  $\text{MgCl}_2$  1mM) a

máxima velocidad. El homogenato fue filtrado através de cuatro capas de gasa y centrifugado a 1000 x g por 10 min. El pellet fue purificado por ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 1 h através de un colchón de sacarosa 2,3 M, MgCl<sub>2</sub> 1mM, dithiothreitol (DTT) 2 mM y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 2 mM. Los núcleos purificados fueron resuspendidos en SMCT (sacarosa 0,3 μM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, Tris 20 mM pH 7,85), 1,25% con Tritón X-100, centrifugado a 250 x g por 3 min., y lavado una vez en SMCT.

El pellet nuclear fue resuspendido en relación 1 ml/g de tejido de SMT (sacarosa 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris 20 mM pH 7,85) conteniendo DTT 20 mM. El contenido de DNA fue determinado por el método de Labarca y Paigen (88). El mismo se basa en la formación de un complejo entre el DNA y un fluorocromo (Hoeschst 33258) medible fluorimétricamente. Los valores de las muestras fueron interpolados en una curva standard de absorbancia vs. concentración.

La máxima capacidad de "binding" y la constante de asociación (K<sub>a</sub>) de "binding" de T<sub>3</sub> a núcleos hepáticos fueron determinados por análisis de Scatchard (89). Los núcleos fueron incubados en SMT con concentraciones crecientes de [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> en un rango de 7,8 x 10<sup>-11</sup> a 2,5 x 10<sup>-9</sup> M.



Un grupo paralelo de tubos conteniendo las mismas cantidades de [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> y T<sub>3</sub> fueron preparados para determinar el binding no específico. Ambos grupos de tubos fueron preparados por duplicado. Después de 135 min. de incubación a 20°C, los núcleos fueron colocados a 0°C y posteriormente centrifugados. Los pellets nucleares fueron lavados dos veces en SMCT conteniendo 0,5% de Tritón X-100 y la radioactividad fue determinada.

## **5. Regulación de los niveles de RNAm de EM**

### **5.1. Extracción de RNA total**

La extracción de RNA total de hígado se llevó a cabo en presencia de isotiocianato de guanidina (90). Posteriormente para una purificación adicional la muestra se sometió a una ultracentrifugación 16 h a 28.000 rpm através de un colchón de CsCl y sucesivos tratamientos con Fenol:Cloroformo.

La extracción de RNA total a partir de cultivos celulares fue llevada a cabo por el método de Chomzinsky (90). El precipitado final de RNA, en cualquiera de los casos, fue resuspendido en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1%, como inhibidor de RNAsas. La

concentración fue valorada por lectura de la absorbancia de una alícuota a 260 nm.

### **5.2. Selección de RNA mensajero**

En los experimentos realizados para la determinación de genes que se expresan en muy baja proporción en hígado, como el de  $\alpha$ -GPD, las muestras de RNA total se sometieron a cromatografía en oligo dT-celulosa (Clontech mRNA separator kit), con el fin de aislar el RNA mensajero poli A<sup>+</sup> según instrucciones de los fabricantes. La concentración fue valorada también midiendo la absorbancia a 260 nm.

### **5.3. Separación de los RNAs por tamaños. Electroforesis**

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído 2,2 M, para asegurar la plena desnaturalización de los RNAs. Se aplicaron 40  $\mu$ g de RNA total, tanto si el RNA procedía de hígado de rata como de células H-35 y HepG2 y 10  $\mu$ g de RNA poli A<sup>+</sup>. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 3 h. La tinción con bromuro de etidio de estos geles revela los 2 RNAs ribosomales 28S y 18S mostrando las posibles diferencias en la cantidad de RNA aplicado en todos los pocillos. En los geles en que se utilizó RNA poli A<sup>+</sup> las membranas fueron hibridadas en primer lugar con la sonda complementaria al RNAm

específico que se quería detectar y luego con la sonda de  $\beta$ -actina como control de carga(91).

#### **5.4. Transferencia de RNA a membranas de Nytran**

La transferencia de RNA a membranas de Nytran se hizo por northern-blot (92). Posteriormente las membranas fueron tratadas con luz ultravioleta en un aparato Stratagene Linker y secadas 15 min. al vacío y 80°C para fijar el RNA.

#### **5.5. Obtención y marcaje de las sondas**

Con todos los plásmidos se siguió el siguiente procedimiento: se transformaron bacterias *E.coli* HB 101 , las cuales fueron tratadas previamente para hacerlas competentes (92). Luego se amplificó y purificó el plásmido siguiendo el procedimiento de lisis alcalina (89). Una vez purificado el plásmido, el inserto se liberó tras la digestión con las enzimas de restricción correspondientes y su posterior elución. El cDNA correspondiente a EM fue donado por la Dra. Vera Nikodem (NIH, Bethesda, Maryland). Debido a un sitio interno de corte para Bam H I, se obtienen 2 fragmentos de DNA de 1,627 y 1,25 Kb. Los dos insertos obtenidos se marcaron con  $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP de Amersham (3000 Ci/mmol), usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y siguiendo las

condiciones recomendadas en el "Kit de random priming" de Pharmacia. Se obtuvo una actividad específica de  $1,5-2 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g aproximadamente. Los insertos marcados se purificaron por cromatografía a través de una columna Nick TM de sephadex G-50 de Pharmacia siguiendo el protocolo sugerido por los fabricantes.

Para el marcaje de las sondas de GAPDH (1 Kb), PEPCK (1,1 Kb) y fueron cortados con PstI y  $\alpha$ -GPDm (2,3 Kb) con Eco RI, los insertos fueron separados en gel de agarosa, eluidos, purificados y posteriormente marcados por random priming como fue descrito para el cDNA de EM.

### **5.6. Hibridación y lavado de las membranas**

Las membranas se prehibridaron durante 2-4 h con 10 ml de una mezcla que contenía 50% de formamida, Denhardt 2%, SSC 6X, 0,5% de SDS y 200  $\mu$ g/ml de DNA de espermatozoos de salmón. Inmediatamente después, las membranas se hibridaron en presencia de 5 ml de la solución de prehibridación conteniendo aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  cpm/ml de la sonda marcada. Para eliminar la radioactividad inespecífica de las membranas, se procedió a una serie de lavados en que se va disminuyendo progresivamente la concentración de sales hasta 2X de SSC y aumentando la de detergente hasta 0,1 % de SDS. Al mismo tiempo la temperatura se va elevando hasta 65°C.

### **5.7. Autoradiografía y cuantificación.**

La autorradiografía con películas Kodak X - Omat o Valca (de menor sensibilidad), y su cuantificación densitométrica permite analizar las diferencias en los niveles de RNAm específicos en cada grupo. Las membranas que contienen el cDNA marcado unido a los RNAm correspondientes, se ponen en contacto con las placas de autorradiografía utilizando una pantalla intensificadora, durante 2-5 días y se mantienen a -70°C para aumentar la nitidez y acelerar el proceso de impresión. En algunos casos para corregir las diferencias cuantitativas en el RNA total aplicado y como verificación de una completa transferencia, se tiñeron las membranas con azul de metileno (93). La cuantificación de la fotografía se usa como factor de corrección. En otros casos las membranas se rehibridaron con una sonda de 28S marcada con  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP, mediante "Nick translation" (92) con las enzimas y tampones contenidos en un "Kit" de BRL. Los resultados se expresan como porcentajes, referidos al grupo en que la expresión es máxima (100%).

### **6. Ensayos de retardo en gel**

Este ensayo sirve para detectar la presencia de proteínas nucleares que se unan a secuencias concretas del DNA de interés. La unión de proteínas a DNA se comprueba cuando, tras haber marcado éste

radiactivamente, se incubaba en presencia de los extractos nucleares, y al someter el producto de ésta reacción a electroforesis y posterior autorradiografía, se compara la posición de las bandas radiactivas (el complejo DNA-proteína quedará retrasado con respecto a la secuencia libre de DNA). En éstas reacciones se añade un exceso de poli dI-dC, para eliminar las uniones inespecíficas. En éste trabajo se estudió la presencia de proteínas nucleares específicas que mediasen la inducción por HCB.

#### **6.1. Oligonucleótidos usados y su marcaje**

Los oligonucleótidos fueron marcados con  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP utilizando polinucleótido quinasa del fago  $T_4$  con el fin de obtener una alta actividad específica (92) y se purificaron en columnas de Sephadex G-50 de Boehringer.

#### **TRE (EM) (40)**

**5'AGG ACG TTG GGG TTA GGG GAC GAC AGT GGA C 3'**

**3'TCC TGC AAC CCC AAT CCC CTG CTG TCA CCT G 5'**

**PPAR(EM)(41)**

5'GGG TCA AAG TTG A 3'

3'CCC AGT TTC AAC T 5'

**AP1 (promotor de la colagenasa) (94)**

5'TCG ACG GTA TCG ATA AGC TAT GAC TCA TCC GGG G 3'

3'AGC TGC CAT AGC TAT TCG ATA CTG AGT AGG CCC C 5'

**CRE full lenght (promotor de la somatostatina) (95)**

5'GAT CCG GCG CCT CCT TGG CTG ACG TCA GAG AGA GAGA 5'

3'CTA GGC CGC GGA GGA ACC GAC TGC AGT CTC TCT CTC T 3'

**SP1 (promotor de SV40) (96)**

5'ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG 3'

3'TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC 5'

**HNF-3 (promotor de transthyretina) (97)**

5'TCG CTA AGT CAA TAA TCA GAA TCA G 3'

3'AGC GAT TCA GTT ATT AGT CTT AGT C 5'

## **6.2. Preparación de extractos nucleares de células**

El procedimiento empleado en el caso de hepatocitos H-35 ha sido descrito por Andrews y col.(98) en el cual, tras la lisis hipotónica de las células se obtienen las proteínas nucleares en presencia de altas concentraciones de sal. El tampón de lisis contiene DTT y PMSF para estabilizar y proteger de la degradación por proteasas respectivamente.

## **6.3. Extractos nucleares de hígado**

Los extractos de hígado fueron obtenidos por el método de Gorski y col. (99). La técnica se describe brevemente a continuación: el hígado se homogeneiza con homogeneizador de teflón (y embolo de vidrio) con un tampón conteniendo 0,25 M de sacarosa, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 50 mM Tris 50 mM pH 7,5 y Tritón 0,2%, en relación 1:3. Se filtra através de gasa y se centrifuga a 3200 rpm durante 4 min., el pellet se resuspende en 2 volúmenes de tampón de homogeneización sin Tritón y se centrifuga nuevamente a 3200 rpm durante 4 min. El pellet es resuspendido en el mismo tampón y colocado sobre un colchón de sacarosa 2 M e igual composición que el tampón de homogeneización. Se centrifuga durante 10 min. a 8000 rpm. Se toma una alícuota del pellet para analizar la integridad de los núcleos mediante tinción con azul de Tripán y observación microscópica. Las proteínas del pellet son luego extraídas incubando a 0°C



con un tampón de lisis de alta sal y altas concentraciones de inhibidores de proteasas como DTT 1mM, PMSF 2 mM, Leupeptina 3,5 µg/ml, Aprotinina 1 mg/ml y Inhibidor de tripsina de Soja (STI) 10 µg/ml durante 15 min. Luego se centrifuga a 45000 rpm en frío para bajar los restos celulares. El sobrenadante se fracciona en alícuotas que se almacenan rápidamente a -70°C. Todo el procedimiento se realizó en cámara fría debido a que en el hígado hay una gran cantidad de proteasas celulares. La proteína fue cuantificada por el método de Bradford (100) con el “kit” de Bio-Rad usando BSA como standard. La concentración de proteínas de cada extracto fue siempre entre 2-5 µg/µl.

#### **6.4. Unión de proteínas al DNA**

15 µg de extractos nucleares se incubaron durante 30 min. a 0°C alternativamente en buffer de binding (cuya composición fue Hepes 40 mM pH 7,9, KCl 200 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,2 mM, 5% de Ficoll y 3 µg de poli dI-dC) con:

- el nucleótido marcado (80.000 cpm), o
- con el mismo, añadiendo un exceso (100 veces más) del mismo oligonucleótido no marcado (ensayo de competición). En este caso el oligonucleótido no marcado desplazará al radioactivo de su unión a las proteínas nucleares.

- con el mismo, añadiendo un exceso (100 veces más) de un oligonucleótido no marcado distinto al marcado (oligonucleótido no relacionado), con el objetivo de probar que la unión es específica.

### **6.5. Separación del complejo DNA-proteína**

Se llevó a cabo por electroforesis que tuvo lugar a 4°C, en geles de 5% acrilamida/bisacrilamida (29:1) en 0,5 X TBE. El gel se somete a preelectroforesis durante 20 min. y electroforesis durante 2 h aproximadamente con una intensidad de corriente de 20 mA (~ 200 voltios). El gel se seca durante 2 h a 80°C. Las autorradiografías se revelaron de 6 a 24 h después de su exposición a - 70°C.

### **7. Ensayo de protección a RNasa**

Debido a que los niveles de RNAm de RTβ1 en hígado son demasiado bajos para ser detectados por northern-blot, se llevó a cabo un ensayo de protección a RNasa.

RNA total de hígado fue preparado por el método de isotiocianato de guanidina y luego fue centrifugado através de un colchón de cloruro de cesio como fue descripto anteriormente para los ensayos de northern-blot.

El RNA total de ratas controles y tratadas con HCB fue hibridado con una ribosonda antisense marcada con <sup>32</sup>P la cual fue generada

utilizando como molde una sonda de cDNA de TRB1, utilizando T7 RNA polimerasa,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P CTP (800 Ci/mmol Amersham Corporation, Aylesbury, UK) y un "kit" de transcripción de riboprobos de Ambion (Ambion RPAII Ribonuclease protection assay kit) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

Como control interno para corregir la cantidad de RNA total cargado en el gel una ribosonda adicional antisense del ribosomal 28S fue transcripta partiendo de pT7 28S RNA. Los niveles de RNAm fueron analizados por ensayos de protección a RNasa con el kit. El procedimiento del ensayo fue esencialmente el descrito por los fabricantes:  $5 \times 10^5$  cpm de ribosonda TRB1 y  $5 \times 10^4$  cpm de 28S fueron incubadas 16 h con 20  $\mu$ g de RNA total. Después de la hibridización las muestras fueron digeridas con mezcla de RNasas (incluyendo 2.50 U/ml de RNasa A y 50 U/ml de ribonucleasa T1) por 2 h a 37°C. Los productos fueron precipitados y los fragmentos protegidos fueron identificados tras electroforesis en gel de poliacrilamida 6% con urea 8,3 M, secado con vacío a 80°C y visualizado por autorradiografía.

Los niveles de RNAm de TRB1 y de RNA ribosomal 28 S fueron cuantificados por scaneado densitométrico del gel en un aparato Instantimager (Packard) y los niveles de RNAm de TRB1 fueron

expresados en unidades arbitrarias después de la corrección con los niveles de ribosomal 28S.

### **8. Ensayo de western-blot**

Extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas (obtenidos como se describe para ensayos de retardo en gel) fueron fraccionados en un gel de SDS-PAGE al 10% y posteriormente hibridado con anticuerpos anti Jun y anti Fos en sendos experimentos. El ensayo realizado se describe a continuación: se aplicaron 20 µg de proteína en cada carril, los geles se someten 5 a 6 h a temperatura ambiente a 80 volts. Luego se transfiere durante 6 h en cámara fría a 50 volts. Posteriormente se prehibrida la membrana con solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar la membrana se la incuba con el primer anticuerpo( dilución 1:1000 de anti Jun o Fos alternativamente)durante 1 h a T° ambiente. Se realiza nuevamente una serie de lavados y se hibrida con el segundo anticuerpo(anti rabbit IgG Biotinilado. Se lava y se hibrida con HRP-Streptavidina (1:1000) durante 1 h a T° ambiente. Se revela con el “kit” de ECL de Amersham. Se exponen las membranas durante toda la noche debido a que Jun y Fos dan muy poca señal, y luego se revela.

**9. Las líneas celulares de hepatoma H-35 y HepG2 como modelo para el análisis de la influencia del HCB sobre la expresión del gen de EM**

**9.1. Medio de cultivo**

La línea celulares de hepatoma de rata H-35 y humanas HepG2 , conservan la mayoría de las propiedades de las células hepáticas. El medio de cultivo contenía DEMEN pH 7,5 + Hepes 10 mM, Gentamicina 75 µg/ml, 5% de suero fetal de ternera, 5% de suero de ternera recién nacida , Fungizona y Glutamina. Las células crecen a una temperatura de 37° C y en una atmósfera que contiene 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

El HCB fue agregado a los cultivos celulares en dosis de 10 nM y 50 nM respectivamente. A las 24 h las células fueron lavadas con PBS y raspadas en guanidinium para la extracción de RNA.

**9.2. Transfecciones transitorias**

**9.2.a. Células y tratamientos**

Las transfecciones fueron llevadas a cabo en células H-35 y HepG2, tras la precipitación de los plásmidos correspondientes con fosfato cálcico (101). El experimento se realizó partiendo de placas conteniendo  $1 \times 10^6$

células, que se incubaron durante la noche con los plásmidos precipitados con  $\text{PO}_4\text{Ca}$ . Tras aspirar el medio y lavar con PBS, las células se incuban con medio de cultivo control durante 24 h. Los tratamientos (a posteriori) con 10 y 50 nM de HCB se realizaron durante 24 h.

### **9.2.b. Plásmidos utilizados**

Los plásmidos usados son:

- a) pME 882-CAT (10  $\mu\text{g}$  por placa).
- b) pME 177-CAT (10  $\mu\text{g}$  por placa).
- c) pUC-CAT (10 $\mu\text{g}$  por placa), vector donde está subclonado el promotor de EM, usado como valor de fondo del ensayo.
- d) RSV-CAT (1 $\mu\text{g}$  por placa), usado como control de funcionamiento del ensayo CAT.
- d) pRSV-LUC (1 $\mu\text{g}$  por placa), cotransfectado con cada uno de los anteriores y usado como control de la eficiencia de la transfección.

Todos estos plásmidos se describen en Materiales y Métodos.

### **9.3. Ensayo de cloranfenicol acetil transferasa (CAT)**

Las células se cotransfectaron con cada una de las construcciones descritas en el apartado anterior. Tras la transfección y después de los tratamientos con HCB las células se recogen en un tampón tris-EDTA

(TEN) y se centrifugan. A continuación se resuspende el pellet celular en un tampón fosfato potásico 0,1 M pH = 7,8 y DTT (que garantiza la estabilidad de las proteínas), y se lisan con 2-3 ciclos de congelación-descongelación precipitándose los desechos celulares por centrifugación, obteniéndose un sobrenadante que contiene las proteínas, a partir del cual se separan alícuotas para la valoración de :

- cantidad de proteínas, por el método de Bradford.
- actividad CAT.
- actividad luciferasa.

De cada grupo experimental se separa un volumen de sobrenadante equivalente a 80 µg de proteínas, para valorar la actividad CAT (102), utilizando 0,2 µCi de <sup>14</sup>C-cloranfenicol.

La incubación en presencia de acetil CoA es de 1 h a 37°C. Tras las extracciones con acetato de etilo, las muestras se resuelven en cromatografía de capa delgada y en presencia de cloroformo:metanol (95:5). La placa se coloca posteriormente en un Instanimager y la imagen revela las posiciones de la placa cromatográfica ocupadas por las formas acetilada y no acetilada. El porcentaje de las formas acetiladas será proporcional a la actividad del enzima CAT y esta será a su vez un reflejo de la actividad del promotor sometido a distintos estímulos.

#### **9.4. Ensayo de luciferasa**

20  $\mu$ g de proteínas del sobrenadante correspondiente a cada muestra son suficientes para el ensayo de actividad luciferasa. La técnica consiste básicamente en la medida de la luz emitida por los extractos celulares (ya que las células expresan la enzima luciferasa por haber sido transfectadas con RSV-I.UC en todos los grupos), al añadir un exceso de sustrato (luciferina) y ATP, en un luminómetro de alta precisión. Las muestras se colocan en viales para el luminómetro y la mezcla de reacción conteniendo luciferina se añade inmediatamente antes de medir puesto que la emisión de luz disminuye en 1 min. al 10% (82).



# **RESULTADOS**

## **1. Efecto del HCB sobre enzimas hormono-tiroideo dependientes**

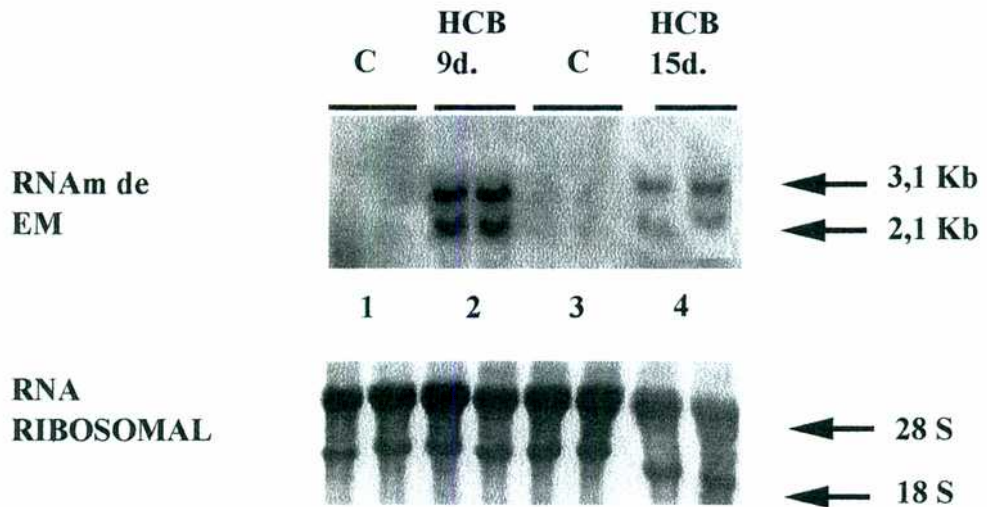
### **1.1. EXPRESION DEL GEN DE LA ENZIMA MALICA EN HIGADO**

En 1995 Kleiman y col. (25) describieron que la intoxicación crónica de animales con HCB producía un importante aumento en la actividad de enzimas hepáticas lipogénicas dependientes de hormonas tiroideas tales como la EM, G6PD y 6PGD.

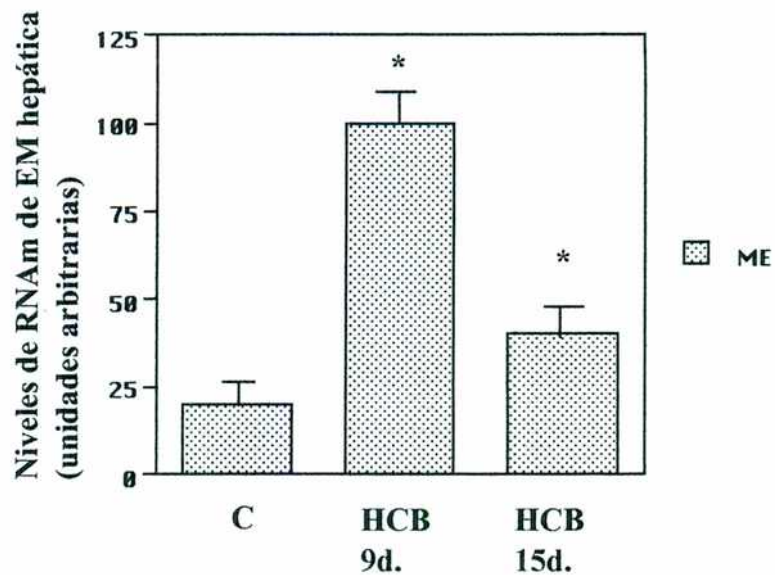
En éste trabajo hemos centralizado nuestra atención en el gen de la EM citosólica hepática. El primer objetivo que nos planteamos fue dilucidar si el incremento inducido por HCB en la actividad de ésta enzima era debido a un aumento en los niveles de su RNAm.

Para estos ensayos, ratas de 160-180 g fueron intoxicadas diariamente con HCB por intubación gástrica, durante 9 y 15 días como se describe en Materiales y Métodos. Estos periodos de intoxicación fueron elegidos debido a que la actividad de EM alcanzó un 75% de su máximo valor después de 9 días de tratamiento con el pesticida, la intoxicación se extendió hasta 15 días momento en el cual los animales manifestaron los primeros síntomas de porfiria hepática (103). Posteriormente fueron sacrificados, el hígado fue perfundido y luego se procedió a su extracción. Se aisló el RNA total para ser analizado por hibridación por northern-blot. Como puede observarse en la figura 1 (carril 2) el tratamiento con HCB

A



B



**Fig.1: El HCB es un potente inductor de la expresión del gen de EM en hígado de rata.**

Panel A: Autorradiografía correspondiente a la hibridación (con la sonda cDNA de EM) de un northern-blot realizado con 40 µg de RNA total extraído de hígado de ratas controles (C) y tratadas con HCB (1g/kg de peso corporal) durante 9 días (HCB 9d.) o 15 días (HCB 15d.). Las flechas indican la posición y el tamaño de los dos RNAs de EM. El gráfico del Panel B refleja la media ± DS de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de normalizar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de 28S y referir los datos al valor máximo.

durante 9 días produjo un potente incremento de 4 veces sobre el control en los niveles de RNAm de EM.

Los animales intoxicados durante 15 días (carril 4) con HCB mostraron un aumento de 2 veces en los niveles de RNAm de EM con respecto al control. Es importante remarcar que este aumento fue menor que el obtenido luego de 9 días de tratamiento.

## **1.2. EXPRESION DE OTROS GENES METABOLICOS REGULADOS POR HORMONAS TIROIDEAS**

Considerando que el HCB induce la expresión del gen de EM, una enzima lipogénica clave que es principalmente regulada por HT, tratamos de investigar la posible influencia de este pesticida en la expresión de genes de enzimas hepáticas de otras vías metabólicas cuya transcripción está regulada también fundamentalmente por HT.

Para esto estudiamos los niveles de RNAm de otras dos enzimas citosólicas: la PEPCK, enzima clave en el proceso de gluconeogénesis y la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que participa en la glucólisis.

Para la realización de éste experimento se intoxicaron ratas durante 9 y 15 días, se obtuvo RNA total de hígado y se realizaron experimentos de northern-blot bajo condiciones experimentales similares a las utilizadas

para EM pero empleando para la hibridación cDNAs de PEPCK y GAPDH respectivamente. Las figuras 2 y 3 muestran que el HCB no produce variaciones en los niveles de RNAm de ninguna de las dos enzimas ni a 9 ni a 15 días de tratamiento.

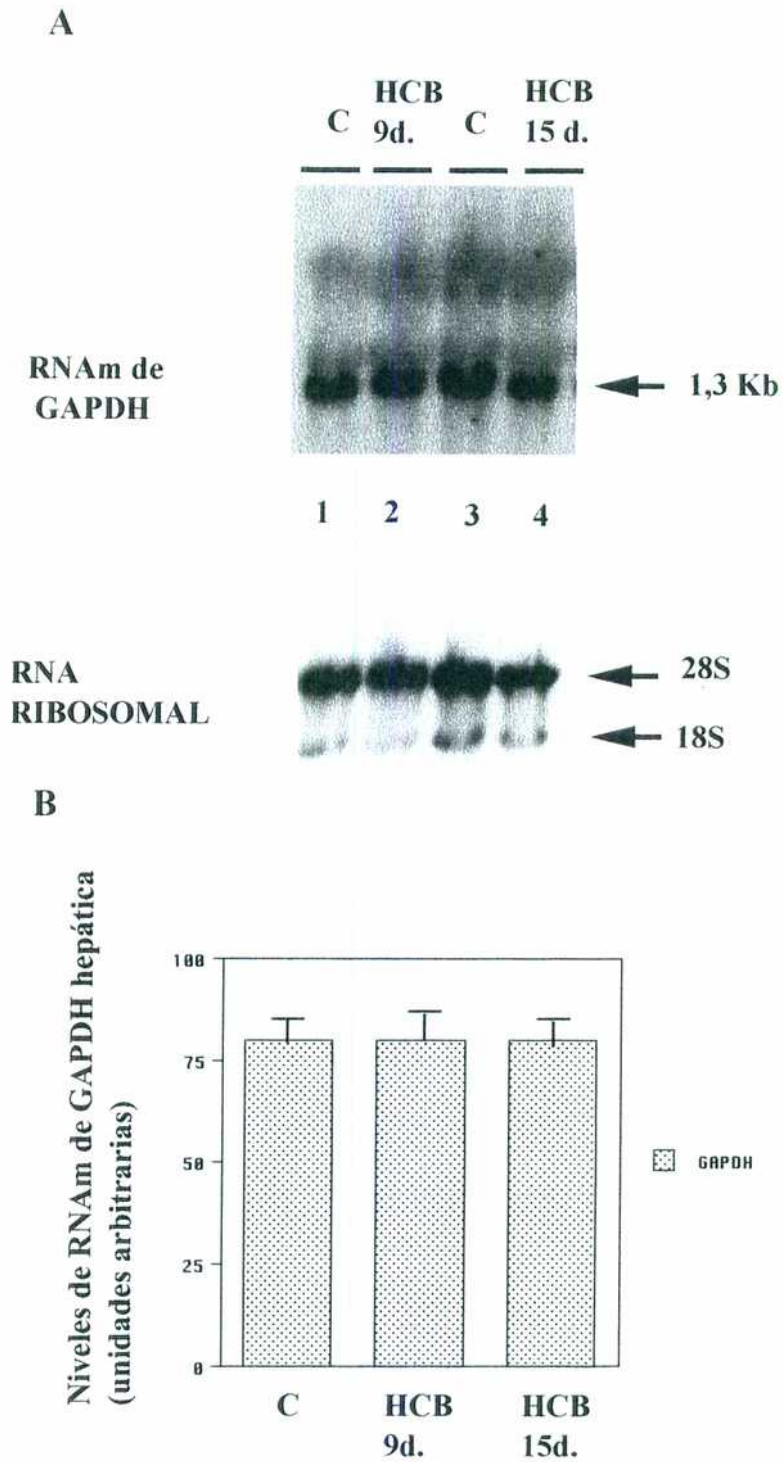
### **1.3. Expresión de enzimas mitocondriales reguladas por hormonas tiroideas**

Trabajos publicados anteriormente habían demostrado que el HCB producía incrementos en la actividad de enzimas lipogénicas citosólicas que responden a HT, sin afectar la actividad de la enzima mitocondrial  $\alpha$ -GPD, también regulada por HT (25).

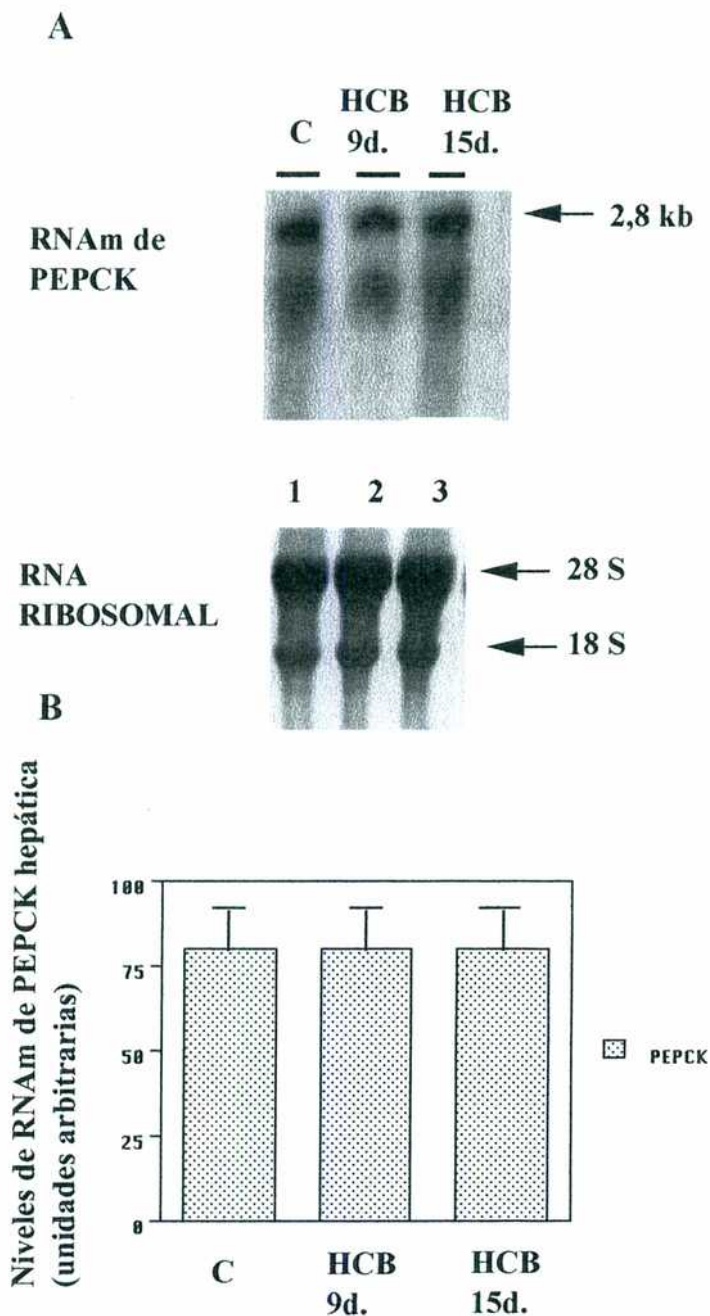
En este trabajo hemos investigado la posible acción del HCB sobre la expresión del gen de la  $\alpha$ -GPD. Para esto se determinaron los niveles de RNAm de dicha enzima por northern-blot en ratas intoxicadas durante 9 y 15 días bajo las mismas condiciones experimentales ya descritas.

Debido a que el gen de  $\alpha$ -GPD mitocondrial tiene una muy baja expresión en hígado como para detectar el RNAm de dicho gen utilizando RNA total, se realizaron experimentos de northern-blot empleando RNA poli A+ obtenido de hígado de ratas de ambos grupos experimentales.

La fig. 4 muestra que el tratamiento con HCB no provocó cambios en los niveles de RNAm de  $\alpha$ -GPD mitocondrial.

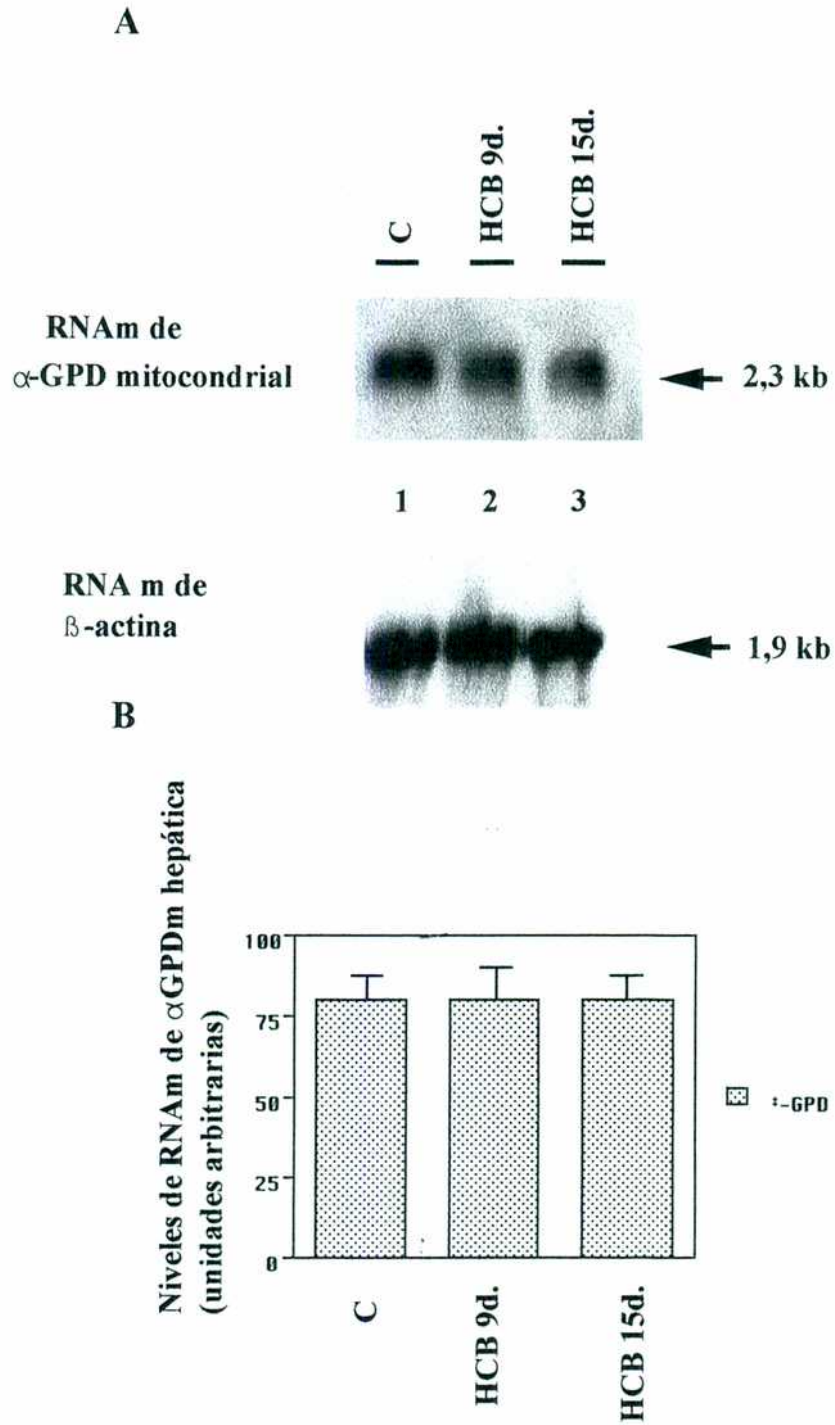


**Fig.2: El HCB no modifica la expresión de GAPDH en hígado de rata.**  
 La autorradiografía del Panel A muestra la hibridación (con la sonda cDNA de GAPDH) de un northern-blot realizado con 40 µg de RNA total extraído de hígado de ratas controles (C) y tratadas con HCB (1g/kg de peso corporal) durante 9 días (HCB9d.) o 15 días (HCB 15d.). La flecha indica la posición y el tamaño del RNAm de GAPDH. El gráfico del Panel B refleja la media ± DS de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de normalizar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de 28S y referir los datos al valor máximo



**Fig.3: El HCB no modifica la expresión de PEPCK en hígado de rata.**

La autorradiografía del Panel A muestra la hibridación (con la sonda cDNA de PEPCK) de un northern-blot realizado con 40 µg de RNA total extraído de hígado de ratas controles (C) y tratadas con HCB (1g/kg de peso corporal) durante 9 días (HCB 9d.) o 15 días (HCB 15d.). La flecha indica la posición y el tamaño del RNAm de PEPCK. El gráfico del Panel B refleja la media ± DS de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de normalizar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de 28S y referir los datos al valor máximo.



**Fig.4: EL HCB no modifica la expresión del gen de  $\alpha$ -GPD mitocondrial en hígado de rata.**

La autorradiografía del Panel A muestra la hibridación (con la sonda cDNA de  $\alpha$ -GPD) de un northern-blot realizado con 10  $\mu$ g de RNA poli A+ extraído de hígado de ratas controles (C) y tratadas con HCB (1g/kg de peso corporal) durante 9 días (HCB 9d.) o 15 días (HCB 15d.). La flecha indica la posición y el tamaño del RNAm de  $\alpha$ -GPD. El gráfico del Panel B:refleja la media  $\pm$  DS de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de normalizar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de  $\beta$  actina y referir los datos al valor máximo.



En conjunto estos resultados parecen indicar que el pesticida afectaría de manera específica la expresión del gen de la EM, sin producir alteraciones en la expresión de otras enzimas hormono-tiroideo dependientes citosólicas o mitocondriales.

## **2. Las hormonas tiroideas como posible blanco de acción del HCB en el proceso de transcripción del gen de EM.**

### **2.1. NIVELES DE T<sub>4</sub> Y T<sub>3</sub> EN TEJIDO HEPATICO**

La EM es un importante marcador del status tiroideo, es decir que a mayores niveles de HT circulantes, mayor es la actividad de esta enzima. Se sabe también que el HCB y otros pesticidas, como las dioxinas provocan en rata una disminución de la T<sub>4</sub> sérica sin alterar los niveles de T<sub>3</sub> (103), forma activa de las HT. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito nos planteamos como una primera hipótesis que el HCB podría sin embargo afectar los niveles de HT intrahepáticos. Para corroborar esta hipótesis se efectuó la medición de la concentración de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> en hígado de ratas controles y drogadas con HCB durante 9 y 15 días, por radioinmuno ensayo como se describe en Materiales y Métodos.

Nuestros resultados demuestran que los niveles hepáticos de T<sub>4</sub> no eran afectados por el pesticida; mientras que los de T<sub>3</sub> eran significativamente disminuidos a ambos tiempos de tratamiento (Tabla 1).

**TABLA 1**

Influencia del HCB sobre los niveles de Tiroxina (T<sub>4</sub>) y Triiodotironina (T<sub>3</sub>) en hígado.

	T <sub>4</sub> (ng/g)	T <sub>3</sub> (ng/g)
Control	33,5 ± 4,8	4,0 ± 0,3
HCB 9 d.	27,5 ± 3,0	2,9 ± 0,1*
HCB 15 d.	31,5 ± 3,7	3,1 ± 0,5*

Los datos representan la media ± DS (n=6). El \* identifica las diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles (p<0.05). Similares resultados se obtuvieron en tres experimentos independientes.

De acuerdo a estos experimentos decidimos estudiar la actividad de las enzimas 5' deiodinasa y 5 deiodinasa hepáticas relacionadas con el metabolismo de las HT. Este estudio se efectuó de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos.

## **2.2. ACTIVIDAD 5' DEIODINASA (5'D) Y 5 DEIODINASA (5D)**

Con el objetivo de evaluar la contribución del metabolismo hepático sobre el metabolismo de las HT, se midió la actividad de la 5'D tipo I (isoforma encontrada en hígado) y la 5 D.

Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que la actividad de la 5'D y la 5 D se encuentra disminuida significativamente en un 55% y 64% respectivamente a los 15 días de tratamiento con HCB.

### **TABLA 2**

Influencia del HCB sobre la actividad 5' Deiodinasa (5'D) de Tipo I y 5 Deiodinasa (5D) en hígado

	5'D Pmol/ min.mg proteína	5 D Pmol/ min.mg proteína
Control	17,7 ± 1,4	250 ± 24
HCB 9 d.	16,0 ± 1,1	222 ± 26
HCB 15 d.	9,7 ± 0,7 *	160,9 ± 13,8*

Los resultados representan la media ± DS (n=6). El \* identifica las diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles (p<0.05). Similares resultados se obtuvieron en tres experimentos independientes.

**2.3. ESTUDIO DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD Y EL N° DE SITIOS RECEPTORES DE T<sub>3</sub> (RT<sub>3</sub>) HEPATICOS EN RATAS INTOXICADAS CON HCB**

Otra posibilidad sería que las características de unión del receptor de HT por su ligando estuviesen afectadas por el HCB.

Con el objeto de estudiar la afinidad del RT<sub>3</sub> por su ligando (T<sub>3</sub>) y el número de sitios de RT<sub>3</sub>, se llevaron a cabo experimentos de Scatchard. Para estos experimentos se utilizaron núcleos de ratas controles y tratadas. La Tabla 3 muestra que los tratamientos de 9 y 15 días con HCB no afectaron ninguno de los dos parámetros característicos de dicho receptor.

**TABLA 3**

Parámetros de unión del RT<sub>3</sub>:

	Kd (nM)	Bmáx (fmol/100µg DNA)
Control	1,9 ± 0,3	3,9 ± 0,4
HCB 9 d.	2,0 ± 0,3	4,5 ± 0,5
HCB 15 d.	1,9 ± 0,4	5,1 ± 0,6

Se aislaron núcleos de ratas intoxicadas con HCB durante 9 y 15 días. La máxima capacidad de unión (Bmáx) y la constante de disociación aparente (Kd) de RT<sub>3</sub> fue cuantificada por análisis de Scatchard. Los resultados representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

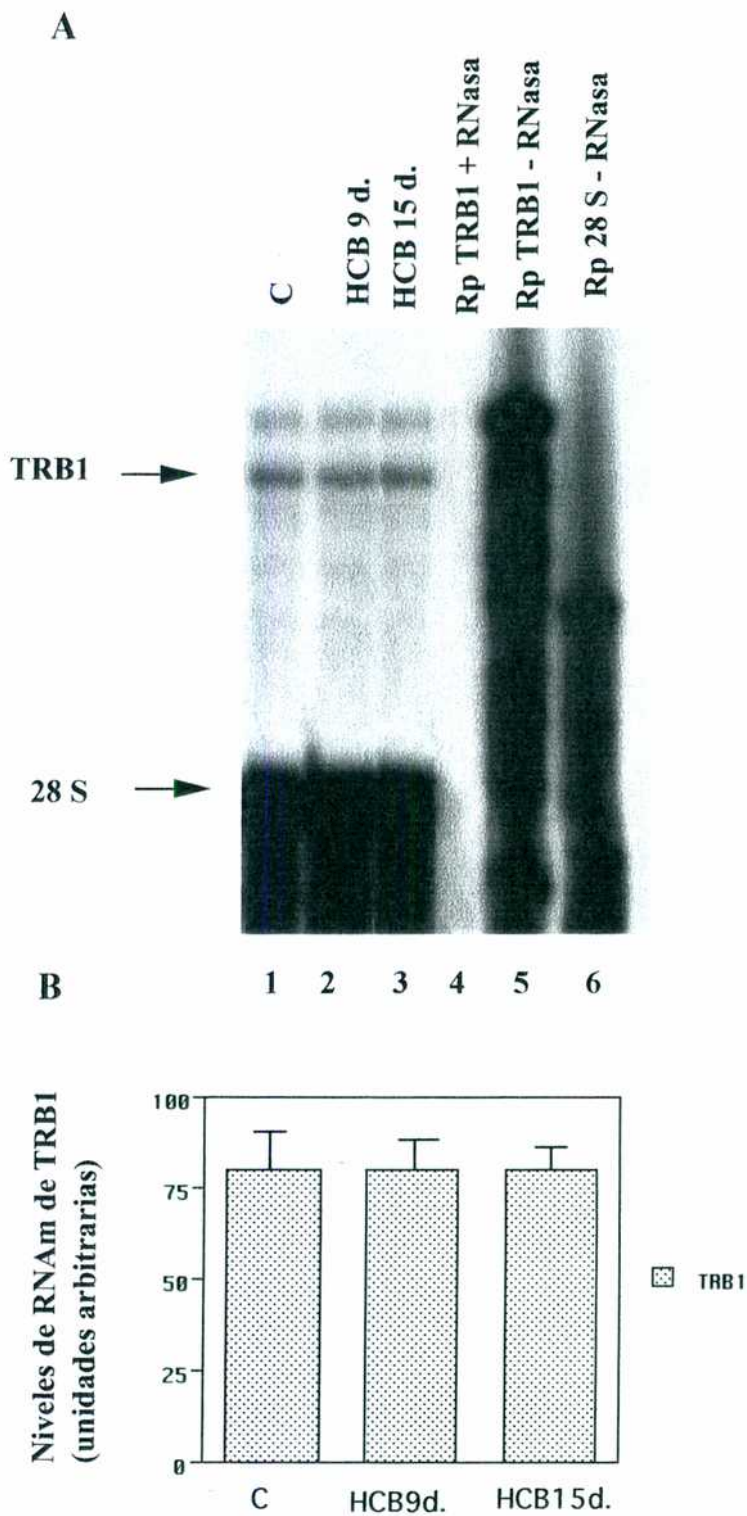
#### **2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON HCB SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE RT<sub>3</sub> HEPÁTICO (TRβ1)**

Con el objeto de dilucidar si el HCB influye sobre la expresión del gen de TRβ1, la principal isoforma de RT<sub>3</sub> encontrada en hígado, y teniendo en cuenta el hecho de que el RNAm de dicho gen es poco abundante en este órgano para ser detectado por northern-blot, se llevaron a cabo ensayos de protección a RNasa.

La figura 5 muestra que los niveles de RNAm de TRβ1 no están afectados por tratamiento con HCB ni con 9 días (carril 2) ni con 15 días de intoxicación (carril 3). Este resultado corrobora la falta de efecto del HCB sobre la concentración de RT<sub>3</sub> que habíamos observado en el experimento de Scatchard.

#### **2.5 ESTUDIO DE LA POSIBLE INFLUENCIA DEL HCB SOBRE LA FORMACION DE COMPLEJOS DNA/PROTEINA SOBRE EL ELEMENTO DE RESPUESTA A HORMONAS TIROIDEAS (TRE) DEL PROMOTOR DE EM**

Los siguientes experimentos se realizaron para estudiar la posible influencia de dicho pesticida sobre la formación de complejos proteicos normalmente inducidos por hormonas tiroideas que se unen a la secuencia

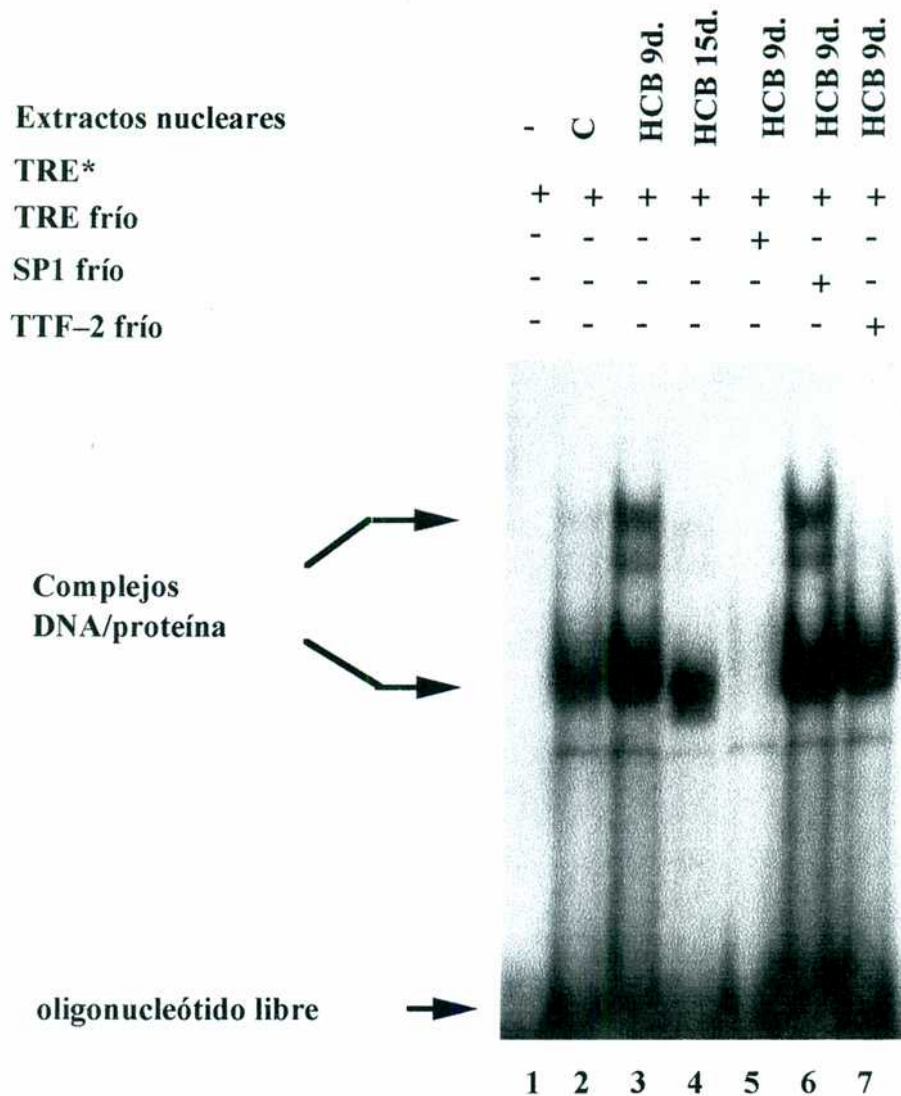


**Fig.5: El HCB no modifica los niveles de RNAm de RTB1 en hígado de rata.** Panel A: Autorradiografía de un ensayo de protección a RNasa representativo. El RNA total extraído de hígado de ratas controles (C) y tratadas con HCB (1g/kg de peso corporal) durante 9 días (HCB 9d.) o 15 días (HCB 15d.) se hibridó con las ribosondas de TRB1 y RNA ribosomal 28S y luego fue digerido con RNasa. Se indican con flechas las bandas de los fragmentos protegidos correspondientes a los RNAm de TRB1 y ribosomal 28S. PANEL B: Escaneado densitométrico después de la corrección con RNAm 28S. Los datos representan la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes y se representan en unidades arbitrarias.

de nucleótidos TRE presente en el gen de EM. Si la formación de estos complejos sufriera algún cambio por tratamiento con el pesticida ésta podría ser una posible explicación del aumento en los niveles de RNAm de EM observados.

Para esto realizamos ensayos de retardo en gel (EMSA) en los cuales 15 µg de extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas fueron testados en cuanto a su habilidad para unirse al oligonucleótido correspondiente a la región TRE (-281/-261) del promotor del gen de EM, marcado radiactivamente. Posteriormente los complejos DNA/proteína formados fueron corridos en un gel de poliacrilamida 5%.

Interesantemente podemos observar en la fig. 6 que tras 9 días de tratamiento con HCB se observa la aparición de dos complejos, uno inferior no regulado (su intensidad es igual en animales controles y tratados con HCB) y otro superior inducido 10 veces, el cual está formado por dos bandas (carril 3). Con 15 días de tratamiento no se observa inducción de ninguno de los dos complejos (carril 4). Los complejos formados son específicos puesto que cuando se compete con el mismo oligonucleótido frío (carril 5) se observa la desaparición tanto del complejo superior como del inferior. Cuando se compete con un oligonucleótido no relacionado (carril 6) como Sp1 estos complejos no desaparecen. Posteriormente probamos la competencia con el oligonucleótido del factor de transcripción



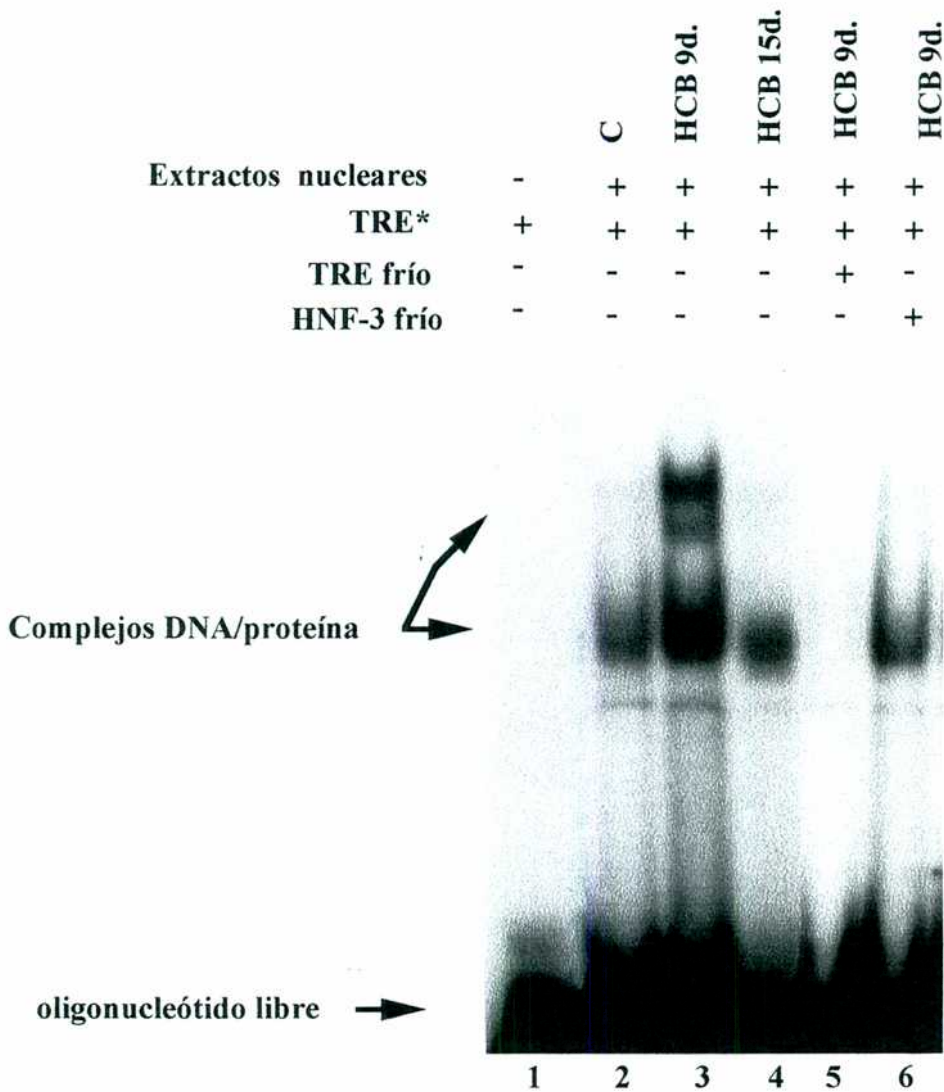
**Fig.6:** El tratamiento durante 9 días con HCB induce la formación de dos complejos proteína/DNA sobre el elemento TRE del promotor de EM. El complejo superior compuesto por dos bandas desaparece cuando se compete con un oligonucleótido TTF-2 frío.

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 2) y tratadas con HCB durante 9 (carril 3) y 15 días (carril 4), identificándose proteínas específicas de unión al elemento TRE. Las bandas de retardo se señalan en la fig. Esta unión es específica puesto que las bandas del complejo superior y la banda del complejo inferior desaparecen cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido TRE frío (carril 5) y no desaparece cuando se incuban con un oligonucleótido SP1 frío (carril 6). Cuando se incuban con un exceso de oligonucleótido TTF-2 frío el complejo superior desaparece (carril 7). Se representa un experimento representativo de tres.



de tiroides N° 2 (TTF-2), el cual suponíamos era no relacionado, ya que se expresa en tiroides pero no en hígado. Para nuestra sorpresa observamos que este oligonucleótido competía totalmente con la formación del complejo inducido (el duplete superior) (carril 7). Este resultado nos llevó a pensar que algún factor de transcripción relacionado estructuralmente con TTF-2 que se exprese en hígado, se uniría al TRE del promotor de EM, estando involucrado en la regulación positiva observada a los 9 días de tratamiento con HCB.

El paso siguiente de nuestra investigación fue realizar ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas con HCB previamente hibridados con el oligonucleótido TRE del promotor de EM pero compitiendo dicha unión con un oligonucleótido de la familia “fork head” que se expresa en hígado. Los genes “fork head” fueron llamados así porque los embriones mutantes para los mismos presentaban el intestino en forma de tenedor (104). Existen numerosos factores de transcripción codificados por esta familia de genes tales como TTF-2, HNF-1, HNF-2, y HNF-3. Aunque hasta el momento no había sido descrita la unión de factores de la familia “fork head” a la secuencia TRE, luego de los resultados observados con TTF-2, decidimos ver como se comportaba otro de los miembros de esta familia, el factor nuclear de los hepatocitos N° 3 (HNF-3). En la fig. 7 podemos observar que al competir

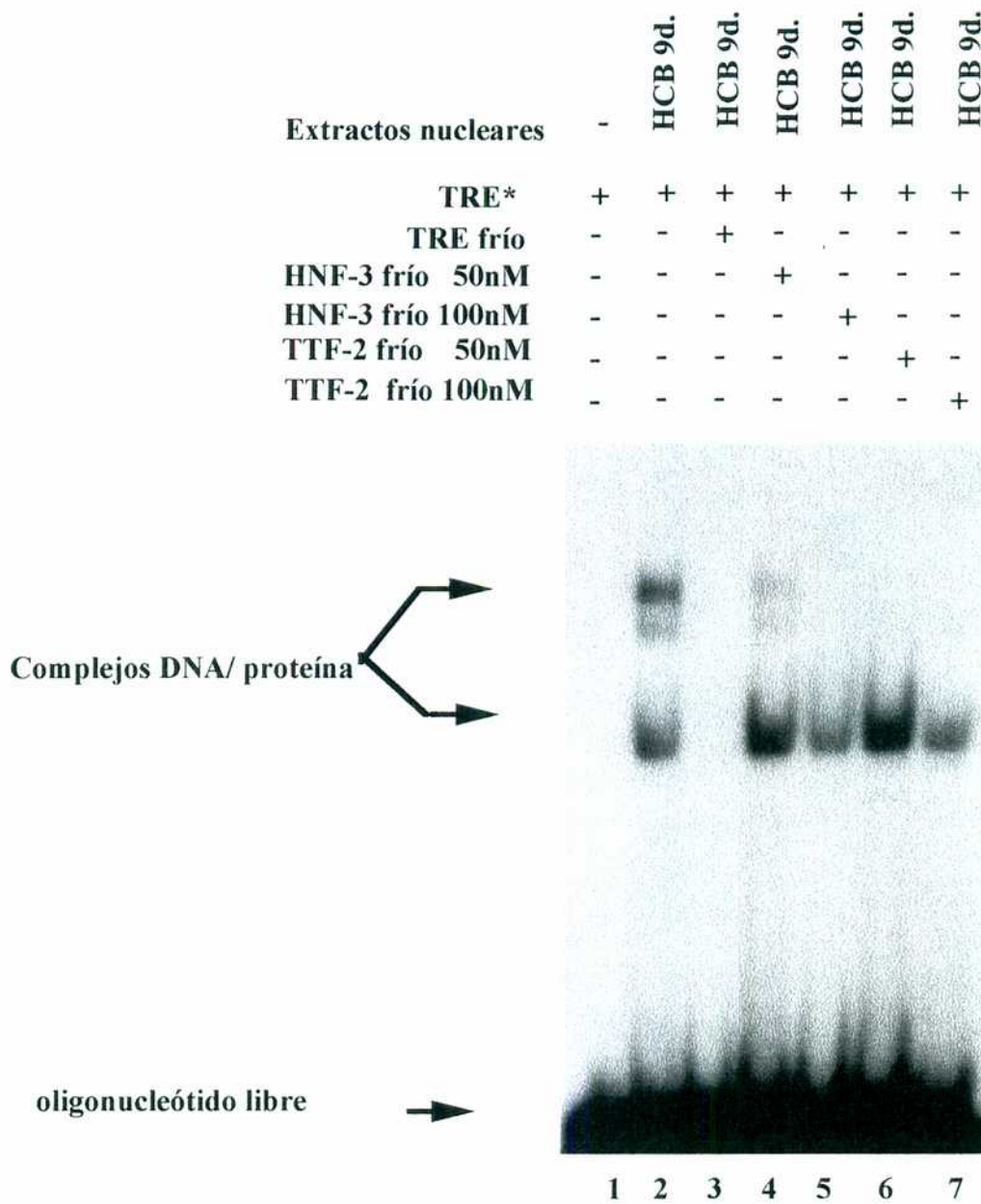


**Fig.7: El complejo superior proteína/DNA formado sobre el elemento TRE del promotor de EM después del tratamiento durante 9 días con HCB desaparece cuando se compete con el oligonucleótido HNF-3 frío.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 2) y tratadas con HCB durante 9 (carril 3) y 15 días (carril 4), identificándose proteínas específicas de unión al elemento TRE. Las bandas de retardo se señalan en la fig. Esta unión es específica puesto que las bandas del complejo superior y la banda del complejo inferior desaparecen cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido TRE frío (carril 5). Cuando se incubó con un exceso de oligonucleótido HNF-3 frío el complejo superior desaparece (carril 6). Se representa un experimento representativo de tres.

con HNF-3 (carril 6) desaparecen las bandas del complejo superior (el cual se ve inducido por tratamiento de 9 días con HCB), pero el complejo inferior no desaparecía. Cuando se competía con el mismo oligonucleótido TRE frío desaparecían ambos complejos (carril 5), sugiriendo que no sería HNF-3 exactamente el factor de transcripción que se une a TRE sino una proteína de estructura semejante relacionada con dicho factor o que sería el HNF-3 uno de varios factores que al pegarse al TRE estimularían la transcripción del gen de EM.

En la fig. 8 podemos observar que el oligonucleótido TTF-2 (carriles 6 y 7) compite más eficientemente que HNF-3 (carriles 4 y 5) con TRE ya que con el primero se observa la desaparición total de las bandas del complejo superior, lo que no ocurre con HNF-3. Esto constituye una evidencia más a favor de la hipótesis de que no sería HNF-3 exactamente el factor que se uniría a TRE sino un factor de transcripción de la familia “fork head” relacionado con éste, o como ya expresamos de ser HNF-3 este estaría involucrado en el conjunto de varios factores que al unirse al TRE producirían un aumento en los niveles de RNAm de EM.



**Fig 8: El complejo superior proteína/DNA formado sobre el elemento TRE del promotor de EM después del tratamiento durante 9 días con HCB es competido más eficientemente por el oligonucleótido TTF-2 frío que por HNF-3 frío.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas tratadas con HCB durante 9 días (carril 2) identificándose proteínas específicas de unión al elemento TRE. Las bandas de retardo se señalan en la fig. Esta unión es específica puesto que las bandas del complejo superior y la banda del complejo inferior desaparecen cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido TRE frío (carril 3). Cuando se incubaba con un exceso de oligonucleótido TTF-2 frío (carriles 6 y 7) o con HNF-3 frío (carriles 4 y 5) el complejo superior desaparece. Se representa un experimento representativo de tres.

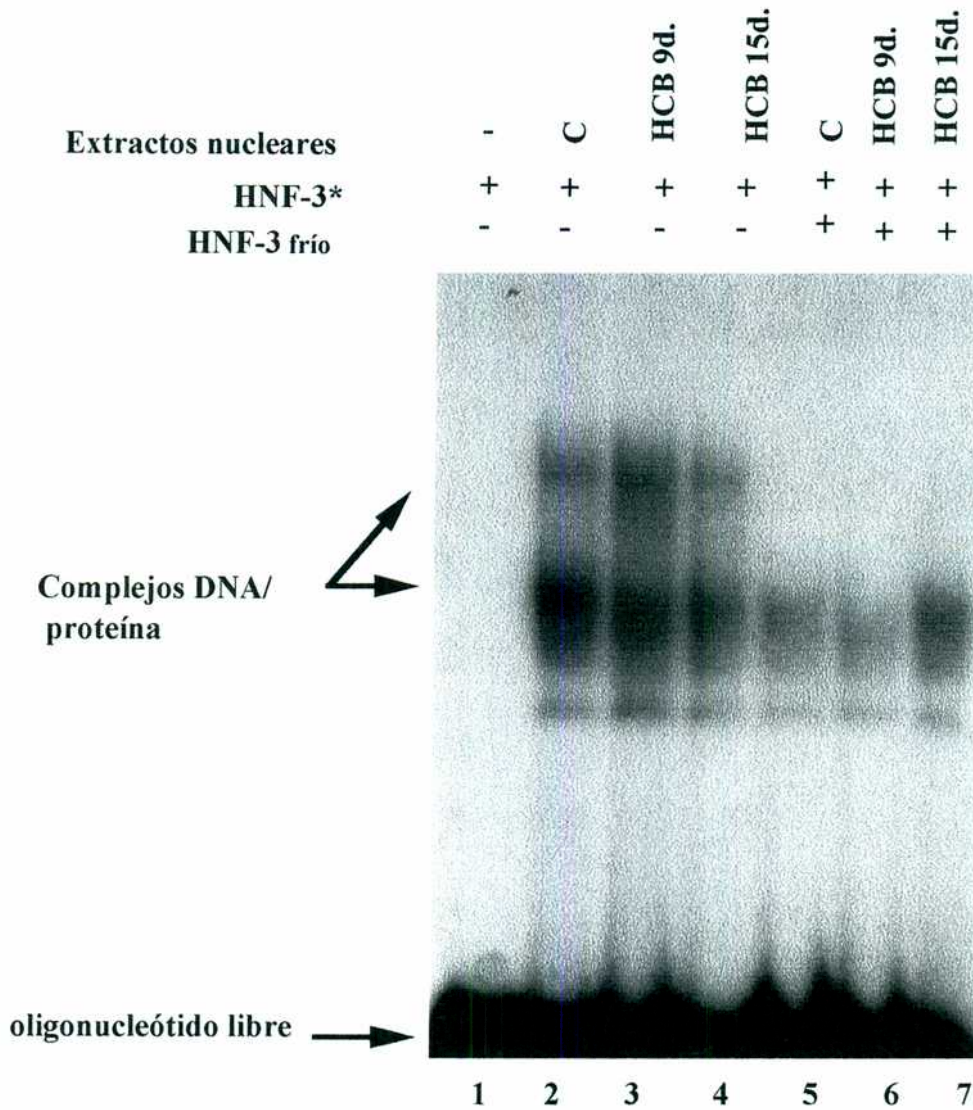
### **3. Posible influencia del HCB sobre HNF-3**

#### **3.1. INTERACCION DE HNF-3 CON EL DNA EN RATAS INTOXICADAS CON HCB**

Se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares obtenidos a partir de hígado de ratas controles y tratadas durante 9 y 15 días, y como oligonucleótido marcado radiactivamente la secuencia de unión del factor de transcripción HNF-3. El objetivo de este experimento fue investigar posibles variaciones causadas por el HCB en la unión del factor de transcripción HNF-3 al DNA.

En la fig. 9 se observa a los 9 días de tratamiento con HCB, una inducción del complejo superior, constituido por dos bandas (carril 3); en tanto que a los 15 días, no se observa esta inducción (carril 4). Cuando se compite con oligonucleótido frío HNF-3 de doble cadena, sólo desaparece el doblete de mayor peso molecular. De acuerdo a estos resultados es posible pensar que la afinidad del complejo superior sea menor que la del complejo inferior y por lo tanto para que el complejo inferior desaparezca se necesitaría aumentar la concentración de oligonucleótido frío.

Para finalizar se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares obtenidos a partir de hígado de ratas controles y tratadas durante 9 y 15 días, y como oligonucleótido marcado



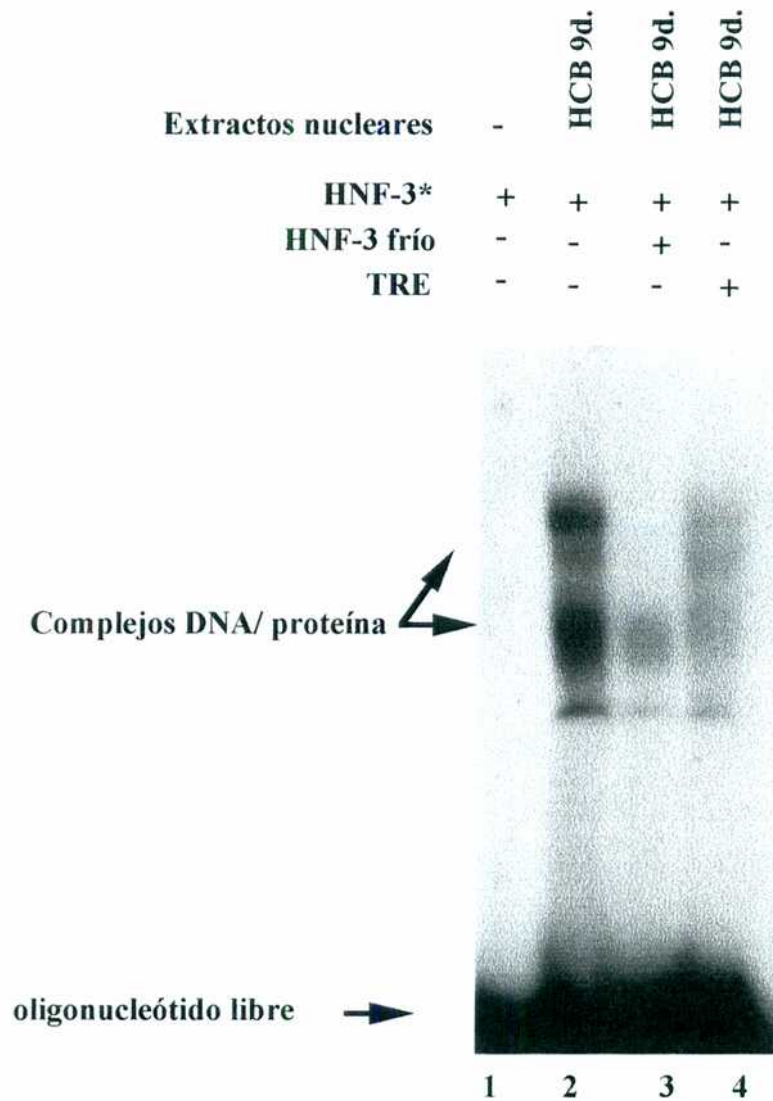
**Fig.9: El tratamiento durante 9 días con HCB induce la formación dos complejos proteína/DNA formado sobre el oligonucleótido HNF-3, el complejo de mayor PM tiene menor afinidad y puede ser desplazado por una menor concentración de HNF-3 frío.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 2) y tratadas con HCB durante 9 (carril 3) y 15 días (carril 4), identificándose proteínas específicas de unión al oligonucleótido HNF-3. La banda de retardo se señala con una flecha. Esta unión es específica puesto que la banda desaparece cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido HNF-3 frío (carriles 5, 6 y 7). Se muestra un experimento representativo de tres.

radiactivamente la secuencia de unión del factor de transcripción HNF-3. A diferencia del ensayo anterior la competencia se realizó con TRE frío. Podemos observar en la fig. 10, la inducción de un complejo superior y otro inferior con 9 días de tratamiento con HCB (carril 2). Al competir con TRE (carril 4) ninguna de los dos complejos desaparece totalmente aunque la intensidad de ambas bandas es menor. Si HNF-3 estuviera uniéndose a TRE esperaríamos que desapareciera el complejo superior, el hecho de que esto no ocurra nos lleva una vez más a concluir que no sería exactamente HNF-3 sino un oligonucleótido relacionado con este, de la familia “fork head”, el que estaría involucrado.

### **3.2. ESTUDIOS DE LOS NIVELES DE RNAm DE HNF-3 EN HIGADO DE RATAS TRATADAS CON HCB**

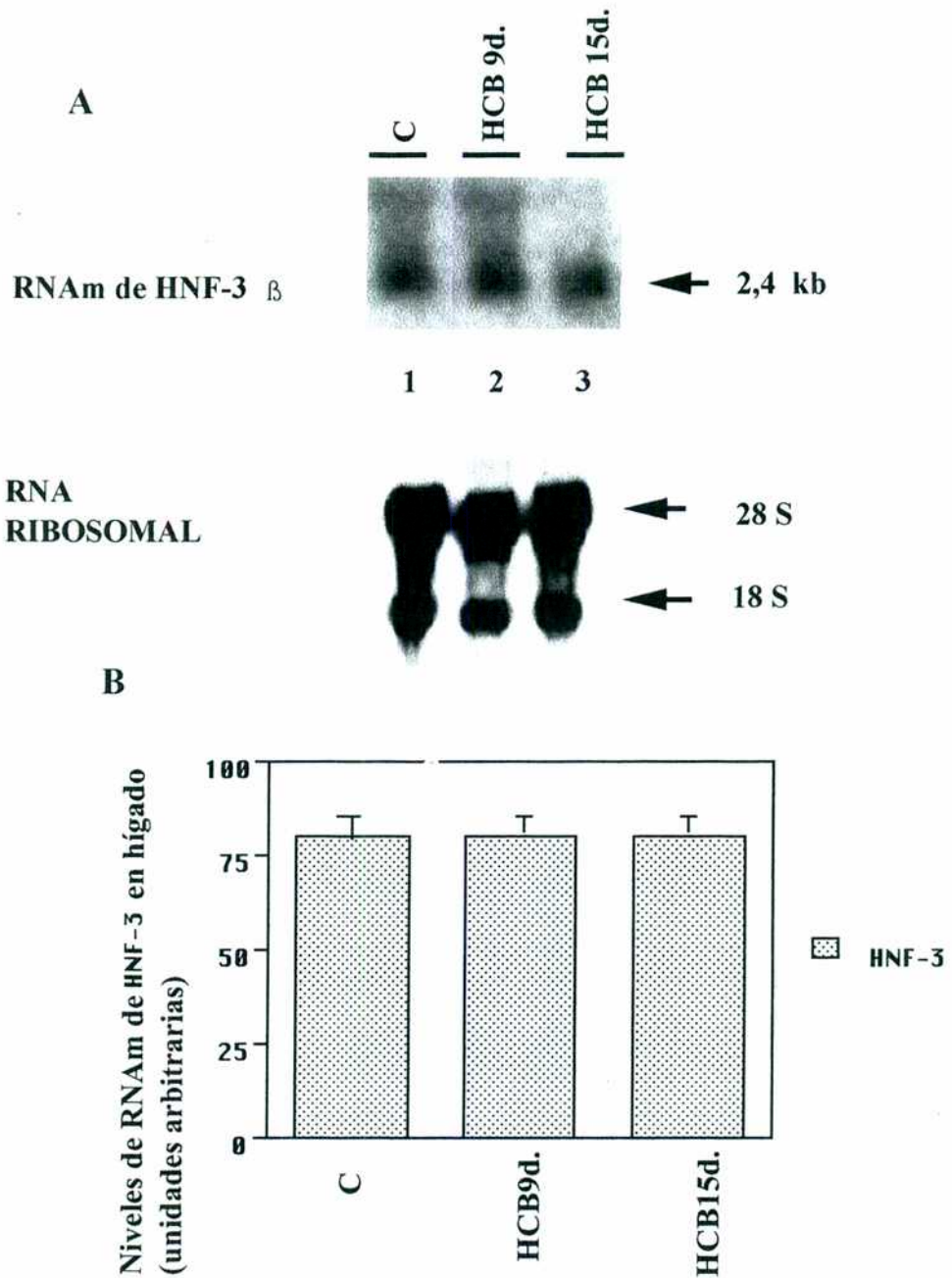
Se realizaron ensayos de northern-blot con el objeto de estudiar si los niveles de RNAm de HNF-3 estaban alterados por el tratamiento con HCB. Para esto se utilizó RNA total extraído de hígado de ratas de ambos grupos experimentales el cual fue hibridado con cDNA de HNF3-β, la cual constituye la principal isoforma de HNF-3 expresada en hígado. No se observaron diferencias en el contenido de RNAm de HNF-3 a ninguno de los dos tiempos de intoxicación. fig. 11



**Fig.10: El complejo proteína/DNA formado sobre el oligonucleótido HNF-3 inducido por el tratamiento durante 9 días con HCB es competido parcialmente por el oligonucleótido TRE frío.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas tratadas con HCB durante 9 días (carril 2), identificándose proteínas específicas de unión al oligonucleótido HNF-3. La banda de retardo se señala con una flecha. La banda del complejo superior desaparece completamente cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido HNF-3 frío (carril 3); las bandas correspondientes a ambos complejos desaparecen sólo parcialmente cuando se compete con TRE frío (carril 4). Se muestra un experimento representativo de tres.





**Fig.11: El complejo proteína/DNA formado sobre el oligonucleótido HNF-3 inducido por el tratamiento durante 9 días con HCB es competido parcialmente por el oligonucleótido TRE frío.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas tratadas con HCB durante 9 días (carril 2), identificándose proteínas específicas de unión al oligonucleótido HNF-3. La banda de retardo se señala con una flecha. La banda del complejo superior desaparece completamente cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido HNF-3 frío (carril 3); las bandas correspondientes a ambos complejos desaparecen sólo parcialmente cuando se compete con TRE frío (carril 4). Se muestra un experimento representativo de tres.

Finalmente podemos concluir que los niveles hepáticos de RNAm de HNF-3 no se regula por HCB, pero si la unión de este factor al DNA.

En conjunto nuestros resultados sugieren que el RT<sub>3</sub> por sí mismo no sería el único y más importante factor de transcripción responsable de la inducción del RNAm de EM causada por HCB y que su presencia sería necesaria dado que dicha inducción puede ocurrir mediante la unión de proteínas al elemento TRE del promotor de EM. RT<sub>3</sub> podría interactuar con otros factores de transcripción, por ejemplo de la familia “fork head”, en la sobreexpresión de dicho gen causada por el pesticida.

Nuestro próximo paso fue entonces estudiar la posible interferencia del HCB sobre la unión de otros factores de transcripción para los cuales existen secuencias de unión en el promotor del gen de EM.

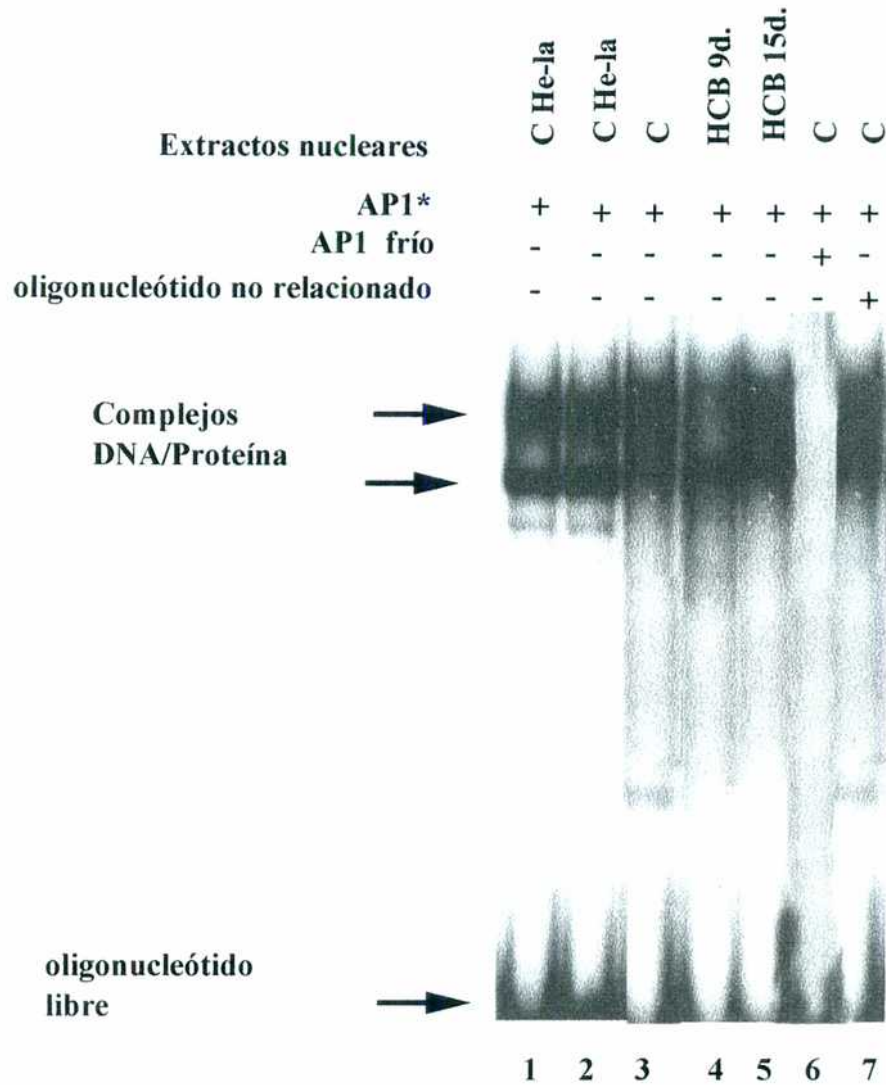
#### **4. El complejo AP1 como posible blanco de acción del HCB**

Según ha sido descrito por Matsumura y col. (17) la unión de dioxinas como el TCDD al receptor citosólico Ahr provoca la activación de quinasas que fosforilan proteínas de membrana como por ejemplo receptores de factores de crecimiento (EGFr), este evento desencadena una cascada de fosforilaciones que incluye la fosforilación de MAPK (quinasa activada en procesos asociados con mitosis). Algunas isoformas de

MAPKs pueden entrar al núcleo y fosforilar factores de transcripción tales como AP1 (dímero Jun/Fos) (camino 2 del mecanismo de acción de tóxicos tipo dioxina, Fig. 1 Introducción). Trabajos recientemente realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el HCB disminuye la actividad de quinasas de tirosina de membrana y produce “down regulation” del EGFr a los 9 días de intoxicación (18). Teniendo en cuenta la existencia de una secuencia de unión a AP1 en el promotor de EM decidimos investigar en primer lugar si el HCB modifica la unión de proteínas nucleares a dicha secuencia. Para esto se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas con HCB durante 9 y 15 días.

La figura 12 muestra que el tratamiento con HCB no modifica significativamente el patrón de bandas de retardo ni a 9 días (carril 4), ni a 15 días de intoxicación (carril 5). Esto indicaría que la unión de AP1 por el DNA no estaría modificada por el tratamiento con el pesticida. Aunque una ligera disminución de la intensidad de la banda de retardo correspondiente a los complejos formados sobre AP1 parecería observarse con 9 días de intoxicación (carril 4).

Posteriormente se analizaron los niveles de proteínas Jun y Fos, constituyentes del factor de transcripción AP1, por western-blot. Para estos experimentos, extractos nucleares de hígado de ratas controles y



**Fig.12: El HCB no modifica los complejos DNA/Proteína formados sobre API.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 3) y tratadas con HCB durante 9 (carril 4) y 15 días (carril 5), identificándose proteínas específicas de unión al oligonucleótido API (el oligonucleótido marcado queda retenido y migra más despacio en el gel, la banda de retardo correspondiente se señala en la fig.). Esta unión es específica puesto que la banda desaparece cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido API frío (carril 6) que competirá con el marcado para unirse a las proteínas y no desaparece cuando se incuban con un oligonucleótido sin marcar no relacionado con API (carril 7) En este mismo gel se corrieron extractos nucleares de células He-la (carriles 1 y 2) para corroborar la posición de las bandas de retardo. Para estos ensayos se utilizó el elemento API del promotor de la colagenasa. Se representa un experimento representativo de tres.

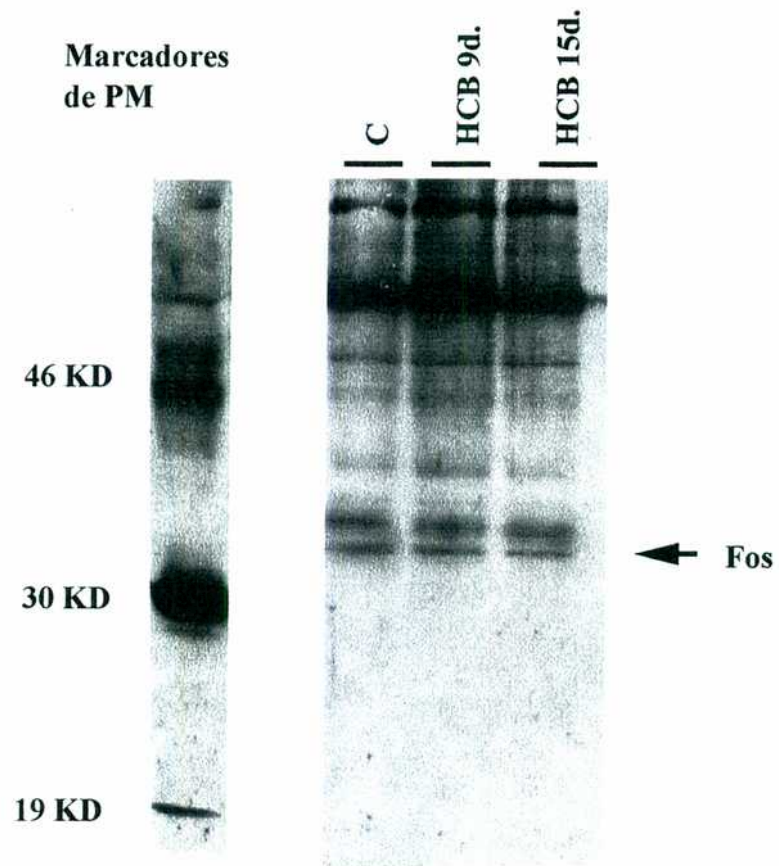
tratadas a ambos tiempos de intoxicación con HCB fueron corridos en un gel, posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa la cual fue hibridada con anticuerpos anti Fos y Jun respectivamente, según se describe en Materiales y Métodos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de dichas proteínas en presencia del pesticida. figuras 13 y 14.

Nuestros resultados sugieren que el factor de transcripción API, no participaría como mediador del HCB en la inducción del gen de EM observado a estos tiempos de intoxicación.

Decidimos investigar entonces la posible influencia del HCB sobre otros factores de transcripción que controlan la expresión del gen de EM.

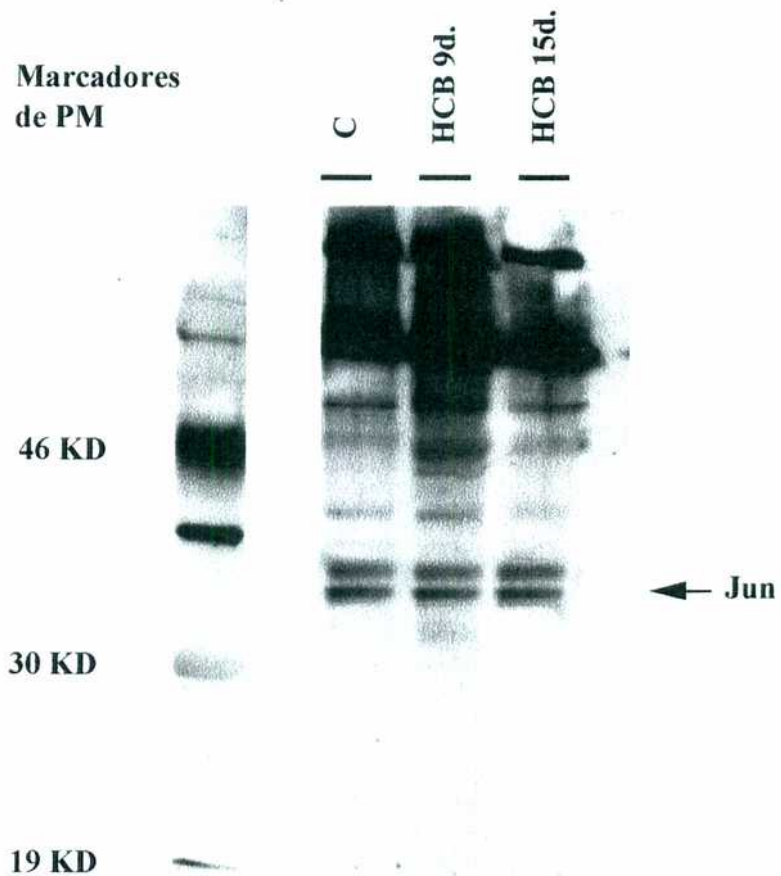
### **5. Papel de PPAR en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB**

Es un hecho conocido que los agentes proliferadores de peroxisomas como el 3 - metilcolantreno inducen la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos ejerciendo su acción a través del factor de transcripción PPAR, el cual constituye el receptor activado de este tipo de agentes. Hertz y col. (66) describieron que estos compuestos inducen un aumento del RNAm de EM hepática por un mecanismo independiente de HT. Estos autores describieron la existencia de un



**Fig.13: El tratamiento con HCB no modifica la concentración de la proteína Fos en hígado.**

La autorradiografía muestra un western-blot utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas con HCB durante 9 y 15 días. Las membranas fueron hibridadas con un anticuerpo anti Fos marcado con peroxidasa. En el primer carril se corrieron marcadores de PM. La banda de 40 KD correspondiente a la proteína Fos se indica con una flecha. Se muestra un experimento representativo de tres.



**Fig.14: El tratamiento con HCB no modifica la concentración de la proteína Jun en hígado.**

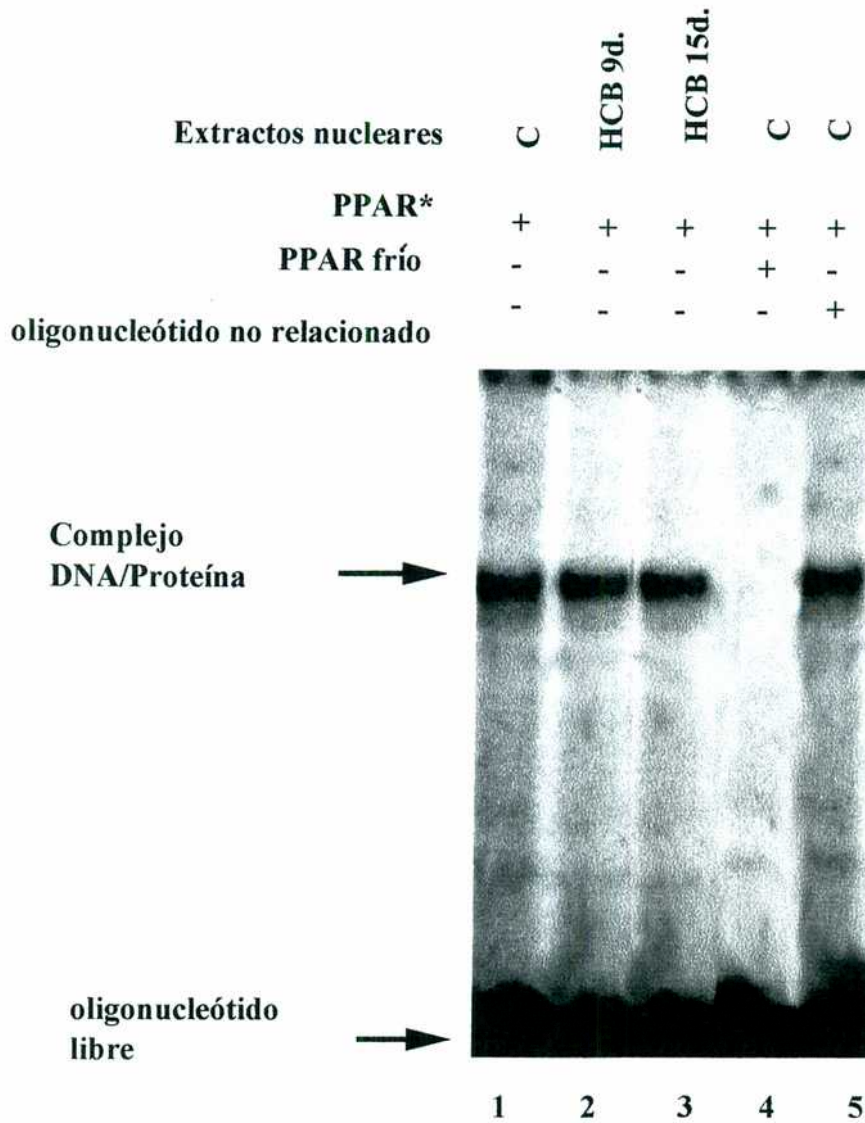
La autorradiografía muestra un western-blot utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas con HCB durante 9 y 15 días. Las membranas fueron hibridadas con un anticuerpo anti Jun marcado con peroxidasa. En el primer carril se corrieron marcadores de PM. La banda de 40 KD correspondiente a la proteína Jun se indica con una flecha. Se muestra un experimento representativo de tres.

## RESULTADOS

elemento de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE) en el promotor de EM al cual se une el PPAR produciendo un aumento en la transcripción de este gen.

Debido a que los proliferadores de peroxisomas producen muchos de los efectos tóxicos compartidos con las dioxinas y tóxicos relacionados nosotros decidimos testar la posible influencia del HCB sobre los complejos proteicos formados sobre el PPRE del promotor de EM. Para esto llevamos a cabo ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles y drogadas durante 9 y 15 días obtenidos como se menciona en los apartados anteriores. Podemos observar en la figura 15 que el patrón de bandas de retardo es el mismo para ratas controles y drogadas a ambos tiempos de intoxicación (carril 2 = 9 días, carril 3 = 15 días), indicando que los complejos de proteínas nucleares que se unen a PPRE no varían con tratamientos con el pesticida a ninguno de los tiempos de intoxicación estudiados. Por lo tanto tampoco PPAR participaría de la inducción del RNAm de EM observado en presencia de HCB.





**Fig.15: El HCB no modifica los complejos DNA/Proteína formados sobre el elemento PPRE del promotor de EM.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 1) y tratadas con HCB durante 9 (carril 2) y 15 días (carril 3), identificándose proteínas específicas de unión al oligonucleótido PPRE del promotor de EM (el oligonucleótido marcado queda retenido y migra más lentamente en el gel, la banda de retardo correspondiente se señala en la fig.). Esta unión es específica puesto que la banda desaparece cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido PPRE frío que competirá con el marcado para unirse a las proteínas (carril 4) y no desaparece cuando se incuban con un oligonucleótido sin marcar no relacionado con PPRE (carril 5). Se representa un experimento representativo de tres.

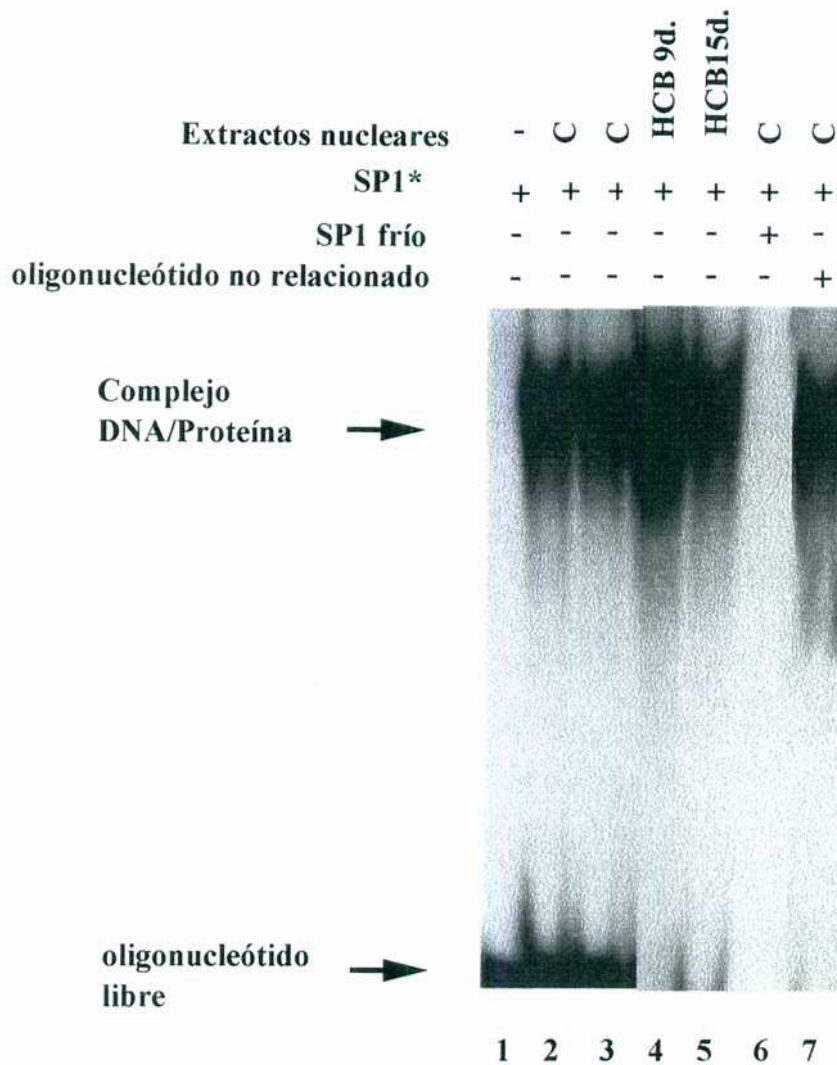
## **6. Papel de Sp1 en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB**

En todos los promotores de los genes constitutivos, incluyendo al de EM se encuentran secuencias de unión al factor de transcripción Sp1. Se ha descrito que el mismo colabora con otros factores de transcripción regulando la expresión de dichos genes, pero nunca se ha citado que por sí mismo sea inductor de la transcripción. Para averiguar si el HCB estaba ejerciendo un efecto específico sobre algunos factores de transcripción se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de hígado de ratas controles e intoxicadas con HCB los cuales fueron hibridados con el oligonucleótido Sp1 del promotor del virus de sarcoma de Rous SV 40.

La figura 16 muestra que la intensidad de las bandas de retardo fue la misma para los extractos nucleares hepáticos de ratas controles y drogadas durante 9 y 15 días demostrando que el HCB no altera los complejos proteicos formados sobre Sp1.

## **7. Papel de CREB en la regulación de la expresión de EM en ratas intoxicadas con HCB**

Teniendo en cuenta que el AMPc inhibe la expresión del gen de EM, decidimos estudiar la posible influencia del HCB sobre un factor de



**Fig.16: El HCB no modifica los complejos DNA/Proteína formados sobre SP1.**

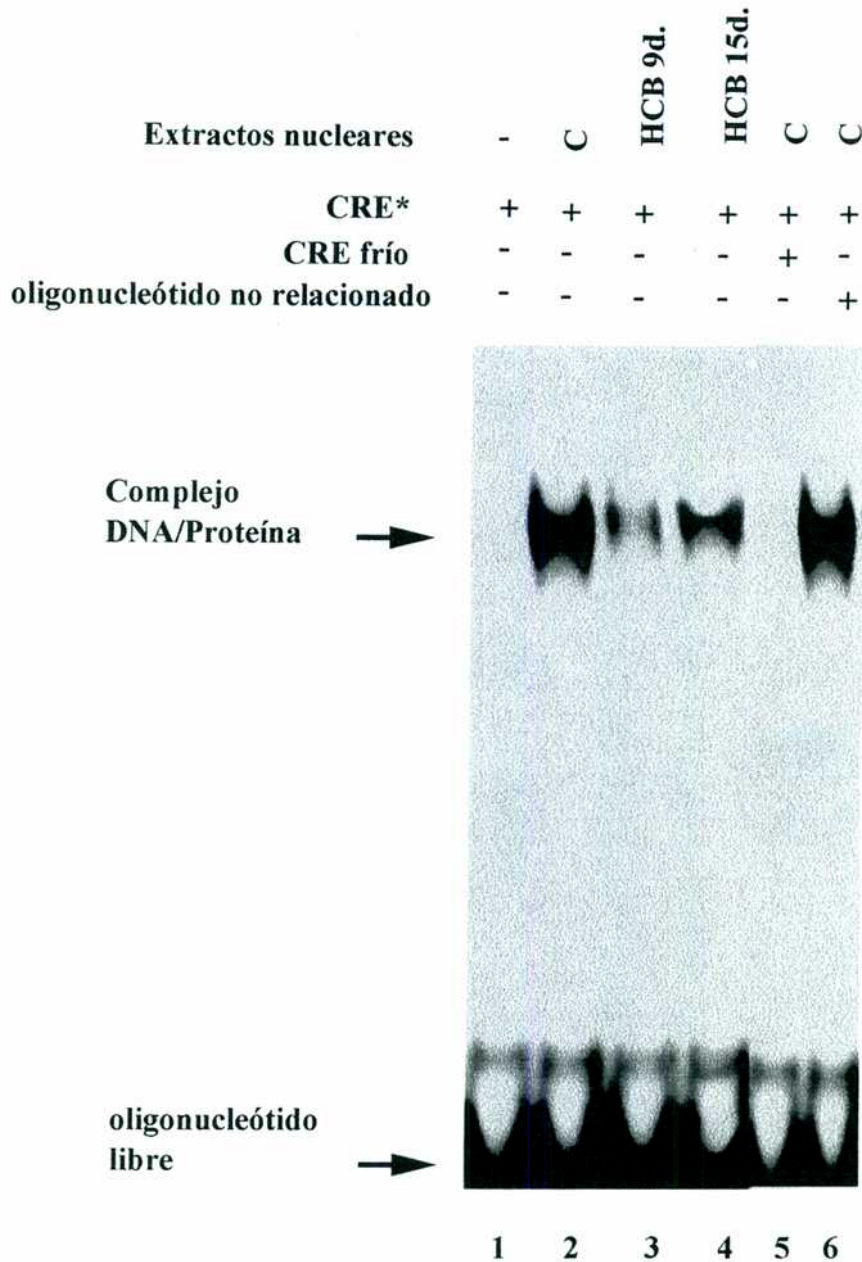
La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carriles 2 y 3) y tratadas con HCB durante 9 (carril 4) y 15 días (carril 5), identificándose proteínas específicas de unión al elemento SP1 (el oligonucleótido marcado queda retenido y migra más despacio en el gel, la banda de retardo correspondiente se señala en la fig.). Esta unión es específica puesto que la banda desaparece cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido SP1 frío (carril 6) que competirá con el marcado para unirse a las proteínas y no desaparece cuando se incuban con un oligonucleótido sin marcar no relacionado con SP1 (carril 7). En estos ensayos se utilizó la secuencia SP1 del promotor de SV 40. Se representa un experimento representativo de tres.

transcripción activado por AMPc, la proteína CREB. Aunque no ha sido descrita una secuencia de unión a este factor en el promotor de EM éste podría ejercer una regulación indirecta sobre la expresión de éste gen. Este estudio se realizó mediante ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de ratas controles y drogadas durante 9 y 15 días y como oligonucleótido marcado la secuencia de unión al factor de transcripción CRE del promotor de somatostatina (fig. 17). Llamativamente, observamos una marcada disminución en la intensidad de la banda de retardo correspondiente a la hibridación de extractos nucleares de ratas drogadas durante 9 días con el oligonucleótido CRE (carril 3). Esto indica que existiría una disminución de la cantidad de proteína CREB unida al DNA o una disminución en su afinidad. A los 15 días (carril 4) la disminución fue menos acentuada.

## **8. Estudios realizados con células**

### **8.1. EFECTO DEL HCB SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE EM EN LA LINEA DE HEPATOMA HEPG2**

El objetivo siguiente fue examinar si los factores de transcripción responsables de la inducción de EM por HCB eran producidos por los hepatocitos en ausencia de estímulos hormonales provenientes de otras



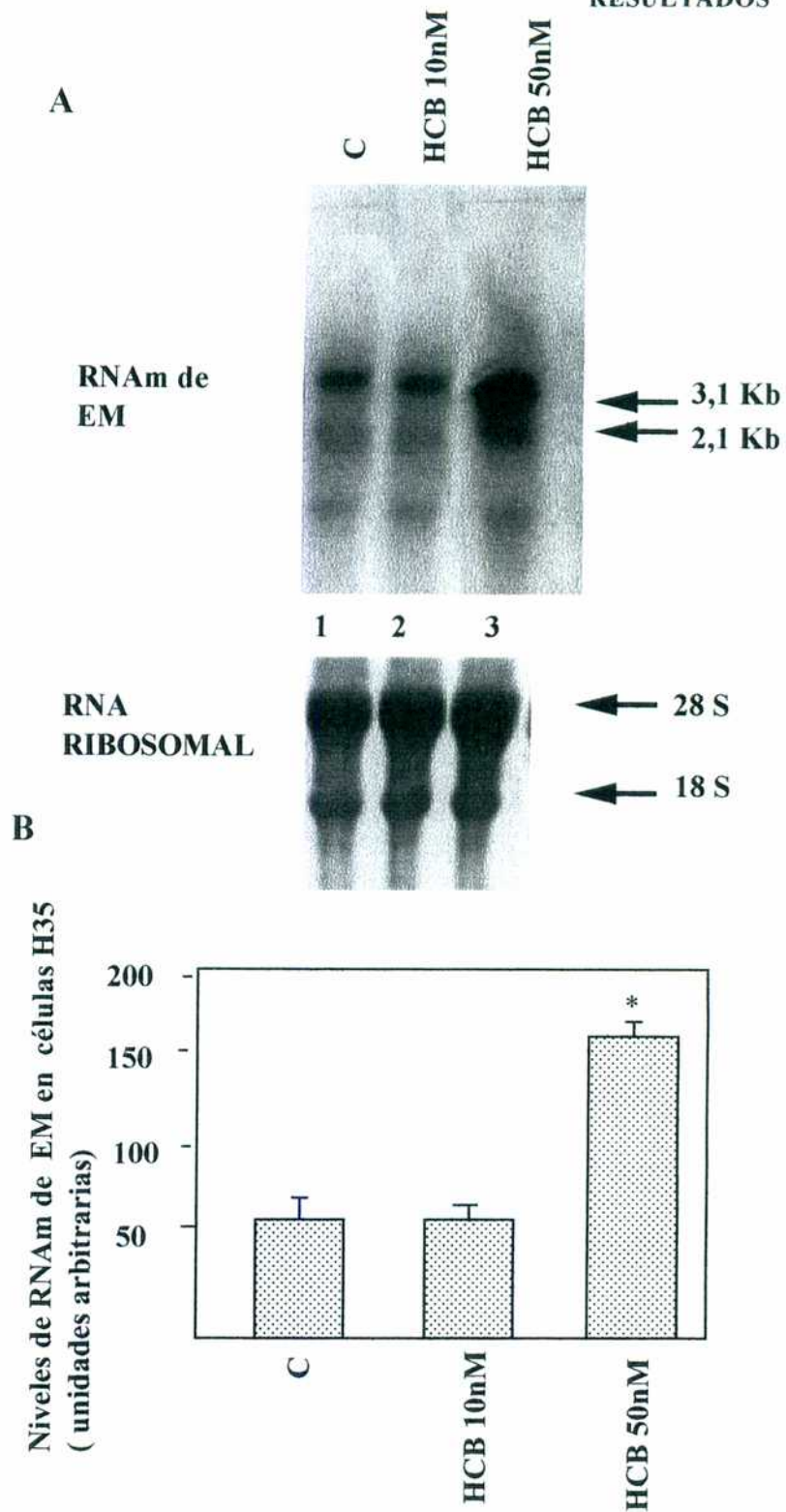
**Fig.17: La intoxicación con HCB por un período de 9 días provoca una disminución de complejos DNA/Proteína formados sobre CRE.**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de ratas controles (carril 2) y tratadas con HCB durante 9 (carril 3) y 15 días (carril 4), identificándose proteínas específicas de unión al elemento CRE (el oligonucleótido marcado queda retenido y migra más lentamente en el gel, la banda de retardo correspondiente se señala en la fig.). Esta unión es específica puesto que la banda desaparece cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido CRE frío (carril 5) que competirá con el marcado para unirse a las proteínas y no desaparece cuando se incuban con un oligonucleótido sin marcar no relacionado con CRE (carril 6). Para estos ensayos se utilizó el elemento CRE del promotor de la somatostatina. Se representa un experimento representativo de tres.

células del hígado u otros tejidos. Para esto se realizaron estudios utilizando líneas celulares de hepatoma de rata H-35 en cultivo. Las mismas fueron crecidas en medio DEMEN y levantadas después de 24 h de estimulación con 10 y 50 nM de HCB respectivamente. Se extrajo RNA total y se analizó el contenido de RNAm de EM mediante experimentos de northern-blot en los que se utilizó cDNA de EM. La figura 18 muestra que una dosis de 10 nM durante 24 h no provoca diferencias significativas en los niveles de RNAm de EM (carril 2). Sin embargo una dosis de 50 nM (carril 3) durante 24 h provocó un aumento en los niveles de RNAm sobre los niveles del control. La inducción del RNAm de EM observado en células de hepatoma coincide con los resultados observados en hígado lo cual sugiere que la inducción de la expresión del gen de EM hepática por HCB está modulada por algún factor producido por los hepatocitos en presencia del pesticida y no por variaciones en las concentraciones de hormonas provenientes del medio.

## **8.2. EFECTO DEL HCB SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE GAPDH CELULAS DE HEPATOMA**

Con el objetivo de estudiar si el tratamiento de células durante 24 h con HCB afectaba los niveles de RNAm de otras enzimas hormono-tiroideo dependientes en células de hepatoma en cultivo se extrajo RNAm



**Fig.18: En células de hepatoma el tratamiento de 24 h con HCB 50nM induce un aumento en los niveles de RNAm de EM.**

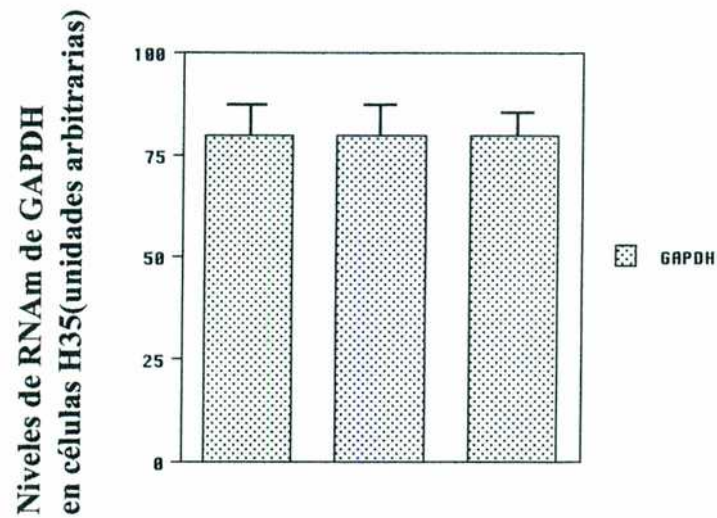
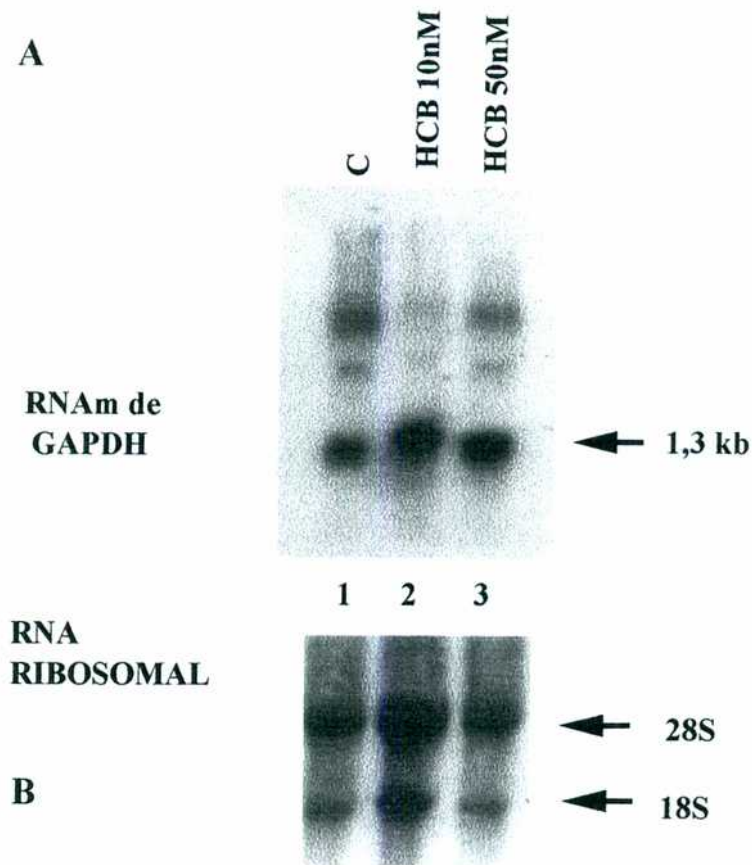
Las células fueron mantenidas en medio DEMEN y posteriormente fueron estimuladas con 10 y 50 nM de HCB, a las 24 h se extrajo el RNA total. El Panel A muestra un northern-blot representativo de estos experimentos hibridado con la sonda de cDNA de EM, marcada radiactivamente. Las flechas indican la posición y el tamaño de los dos RNAm de EM. El gráfico del Panel B:refleja la media  $\pm$  la DS de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de normalizar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de 28S y referir los datos al valor máximo.

y se realizaron experimentos de northern-blot utilizando cDNA de GAPDH. En la figura 19 se puede ver que el tratamiento con HCB no modificó los niveles de RNAm de GAPDH. Estos resultados fueron obtenidos trabajando con células HepG2, los resultados en células H-35 no fueron diferentes. En conjunto los resultados obtenidos trabajando con células de hepatoma coinciden con lo observado en hígado indicando que el HCB producía una inducción específica del RNAm de EM.

### **8.3. DETECCION DE LA ZONA DEL PROMOTOR DE LA EM INVOLUCRADA EN LA REGULACION POSITIVA DE DICHO GEN POR HCB**

Con el objeto de acotar la zona del promotor que resulta fundamental para el incremento en la expresión del gen de EM, observado en presencia de HCB se realizaron transfecciones transitorias en células H-35 con plásmidos conteniendo como inserto el promotor completo de EM (pME -882) y una delección de dicho promotor (pME -177) unidos en ambos casos al gen “reporter” de la Cloranfenicolacetil-transferasa (CAT). Luego las células transfectadas fueron estimuladas con HCB (10 y 50 nM) durante 24 h y se midió actividad CAT, como se describe en Materiales y Métodos.





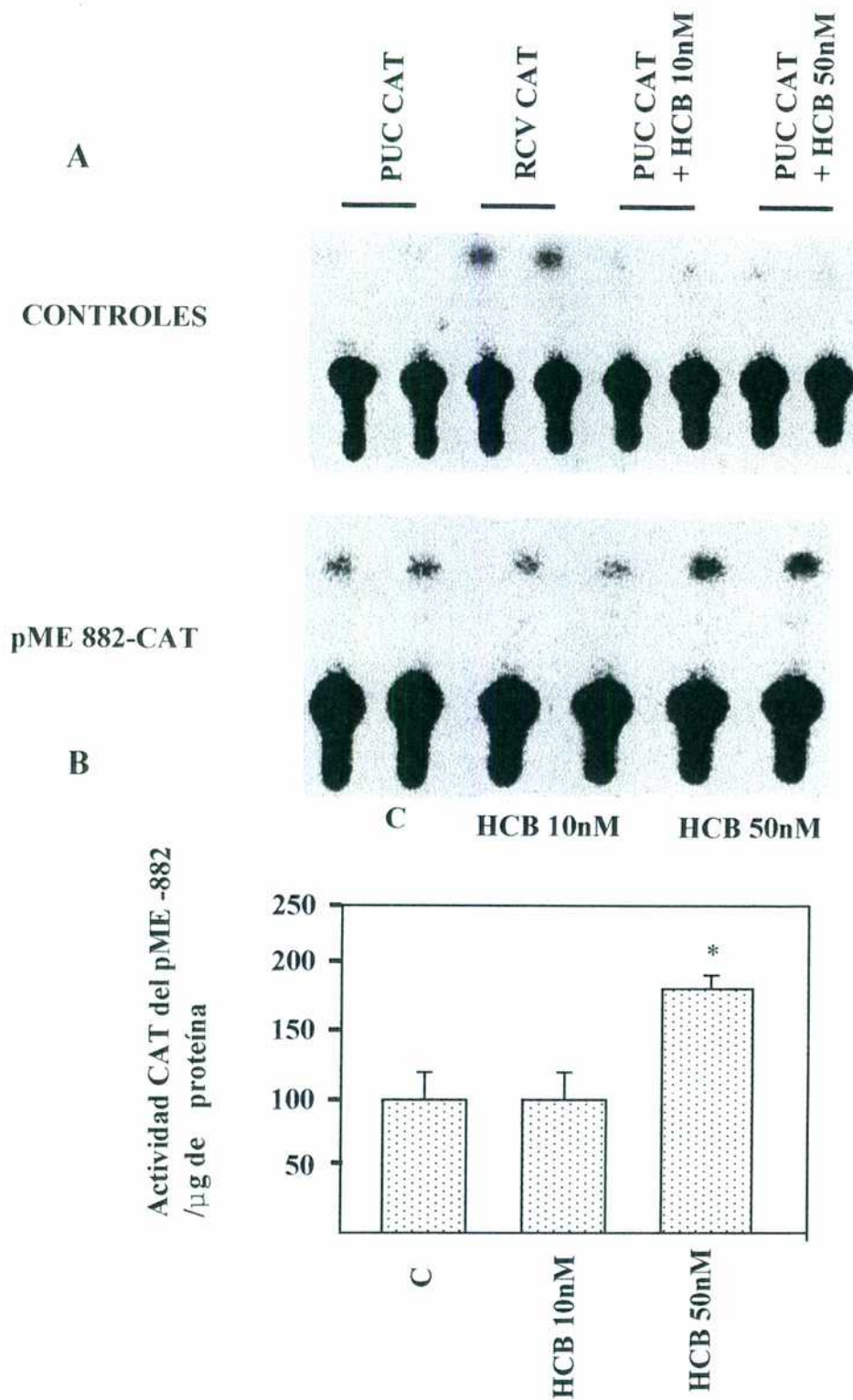
**Fig.19:** En células de hepatoma de rata H-35 el tratamiento de 24 h con HCB 10nM y 50nM no inducen variaciones en la expresión del gen de GAPDH.

Las células fueron mantenidas en medio DEMEN y posteriormente fueron estimuladas con 10 y 50 nM de HCB, a las 24 h se extrajo el RNA total. El Panel A muestra un northern-blot representativo de estos experimentos hibridado con la sonda de cDNA de GAPDH, marcada radiactivamente. Las flechas indican la posición y el tamaño del RNA mensajero de GAPDH. El gráfico del Panel B: refleja la media  $\pm$  la desviación standard de tres experimentos similares al mostrado en la autorradiografía del panel A. Los resultados se representan en unidades arbitrarias después de uniformar los datos del densitómetro corrigiendo con el RNA de 28S y referir los datos al valor máximo.

La figura 20 muestra que cuando se transfectó con el promotor entero (PME -882) el HCB 50 nM provocó un aumento en la actividad del promotor de EM de 2 veces sobre los niveles del control. Cuando se transfectó con el promotor deleciónado (fig. 21) no se observa inducción de la actividad del promotor por HCB, corroborando que la zona deleciónada contiene una secuencia fundamental en la regulación de la expresión de EM por HCB. Es decir que la misma se encontraría río arriba, comprendida entre -177 y -882.

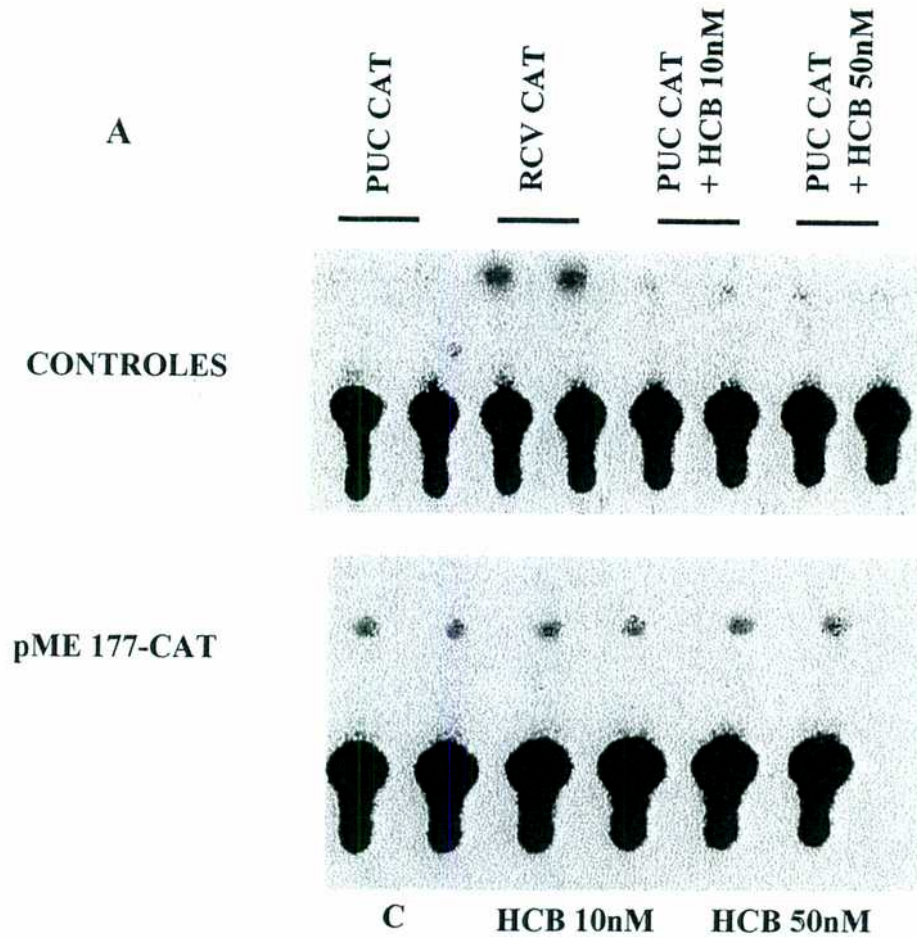
#### **8.4. REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA EM ATRAVES DEL ELEMENTO TRE UTILIZANDO CELULAS DE HEPATOMA**

Se realizaron ensayos de retardo en gel con el oligonucleótido TRE consenso del promotor de EM. Para esto se utilizaron extractos nucleares obtenidos de células de hepatoma H-35, controles y estimuladas durante 24 h con HCB en dosis 10 nM y 50 nM. En la figura 22 se observa una inducción del complejo superior con dosis 50 nM (carril 3). El complejo formado es específico puesto que es competido por sí mismo (carril 4). Esto coincide con el hecho de que la estimulación de células de hepatoma con 50 nM de HCB durante 24 h producía una inducción marcada en el contenido de RNAm de EM (fig. 18). Esta estimulación no

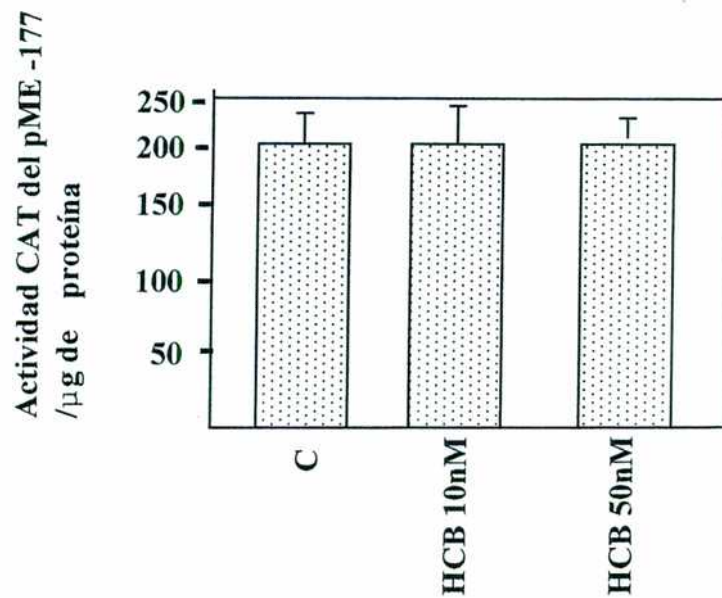


**Fig.20:** En hepatocitos de rata H-35 transfectados transitoriamente con el promotor completo de EM (-882 pb) el tratamiento con HCB aumenta la actividad de dicho promotor.

Las células crecieron en un medio DEMEN. El HCB fue agregado a los cultivos 48 h después de las transfecciones con los plásmidos que contienen el fragmento de -882 pb del promotor de EM. Los cultivos fueron levantados a las 24 h y se prepararon extractos para la determinación de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y luciferasa. En el Panel A se observa que una dosis de 10 nM de HCB produce una disminución de la actividad del promotor de EM con respecto a los valores del control. Una dosis de 50nM produjo un incremento de la actividad de dicho promotor. En el panel B se representa la actividad del promotor como actividad de CAT/ µg de proteína. La actividad del grupo control se considera como el 100%. Los resultados reflejan la media ± la DS de tres experimentos independientes.

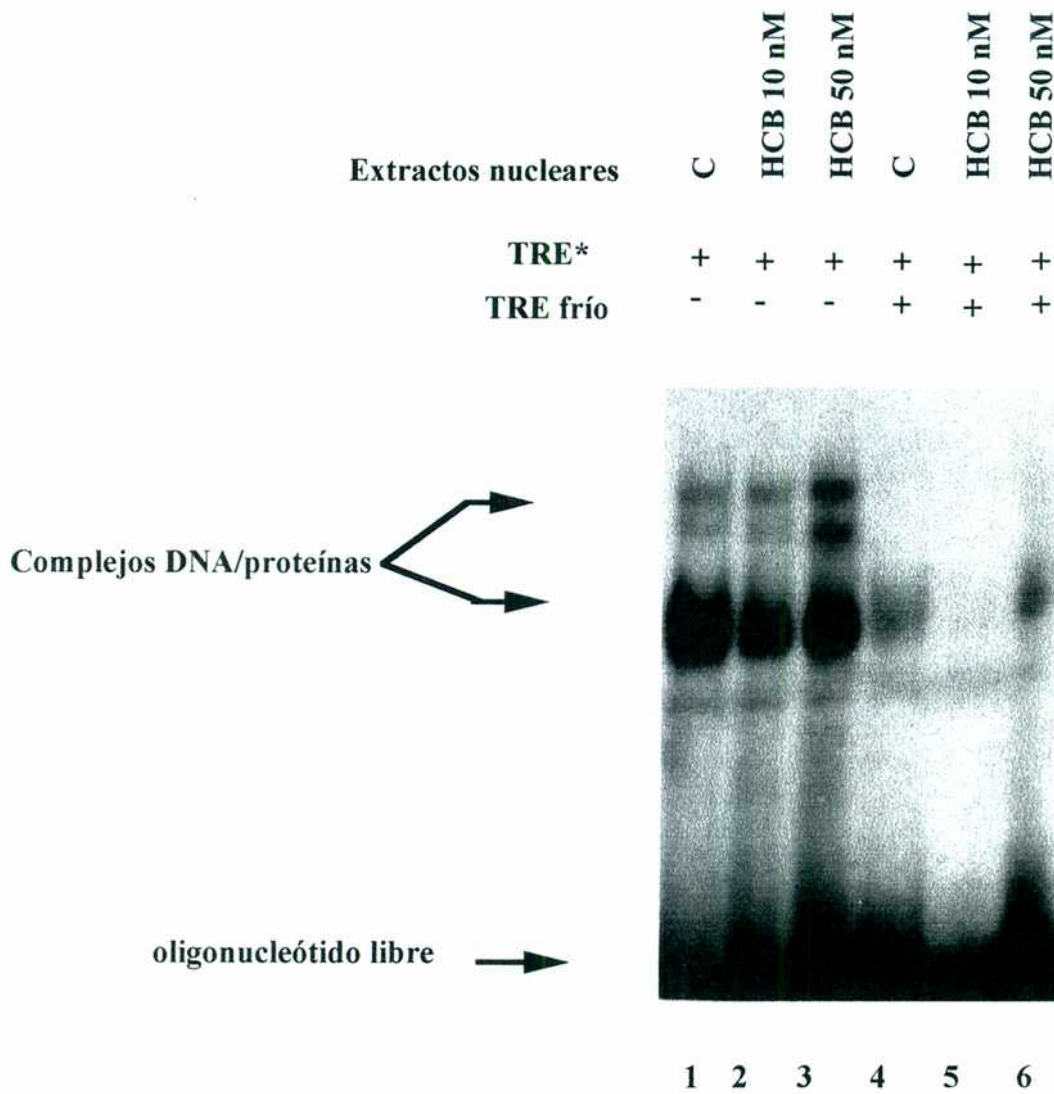


B



**Fig.21:** En hepatocitos de rata H-35 transfectados transitoriamente con un fragmento de 177 pb del promotor de EM el tratamiento de 24 h con HCB no afecta la actividad de dicho promotor.

Las células crecieron en un medio DEMEN. El HCB fue agregado a los cultivos 48 h después de las transfecciones con los plásmidos que contienen el fragmento de 177 pb del promotor de EM. Los cultivos fueron levantados a las 24 h y se prepararon extractos para la determinación de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y luciferasa. En el panel B se representa la actividad del promotor como actividad de CAT/ µg de proteína. La actividad del grupo control se considera como el 100%. Los resultados reflejan la media ± la DS de tres experimentos independientes.



**Fig.22: En extractos nucleares de células de hepatoma en cultivo estimuladas durante 24 h con 50nM de HCB se observa una inducción del complejo superior formado sobre TRE**

La autorradiografía muestra un ensayo de retardo en gel utilizando extractos nucleares provenientes de hígado de células de hepatoma controles (carril 1) y tratadas con 10nM (carril 2) y 50 nM de HCB (carril 3), identificándose proteínas específicas de unión al elemento TRE. Las bandas de retardo se señalan en la fig. Esta unión es específica puesto que las bandas del complejo superior y la banda del complejo inferior desaparecen cuando los extractos nucleares se incuban además con un exceso de oligonucleótido TRE frío (carriles 4, 5 y 6).. Se representa un experimento representativo de tres.

se observaba con una dosis de 10 nM de HCB. Por otro lado cuando se realizaron transfecciones con el promotor entero de EM obteníamos una estimulación de la actividad de dicho promotor con una dosis de 50 nM, no observándose variaciones con respecto a la actividad basal del mismo con una dosis de 10 nM de HCB (fig. 20).

Los resultados indican que la regulación de la expresión del gen de la EM por HCB se ejerce através de un elemento situado río arriba de -177 pb, y teniendo en cuenta que el TRE se encuentra entre -281/-261 podría ser este el elemento sobre el cual este pesticida induce la regulación de dicho promotor.

Futuros estudios están encaminados a la identificación total de la/s proteínas que forman el complejo inducido.

## **DISCUSSION**

### **1. Papel de las IIT en la inducción de la expresión del gen de la EM por HCB**

En este trabajo hemos demostrado por primera vez que el tratamiento crónico de ratas durante 9 y 15 días con HCB provoca un potente aumento en los niveles de RNAm de la EM hepática. Considerando que esta enzima cumple una función fundamental en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono y su expresión es inducida por este pesticida, dicha regulación constituye un interesante modelo para el estudio del mecanismo de acción del HCB.

Nuestros resultados están en concordancia con los publicados por Kleiman y col. los cuales indicaban que el HCB provocaba un incremento en la actividad de enzimas hormono-tiroideo dependientes tales como EM, G6PD y 6PGD (25). También fue descrito que el TCDD provocaba un incremento en la actividad y los niveles de RNAm de EM (26).

El efecto observado sobre el incremento de los niveles de RNAm de EM por HCB debe ejercerse al menos en parte a nivel transcripcional. Aunque en este trabajo no se hayan presentado experimentos que determinan la tasa de transcripción (experimentos de "run-on") el hecho de que en células de hepatoma H-35 el HCB sea capaz de aumentar la actividad del promotor completo del gen de EM nos está diciendo que los efectos del HCB tienen lugar a nivel transcripcional. Sin embargo el hecho



de que la inducción del RNAm de EM por HCB en hígado de rata sea de 4 veces, mientras que el aumento encontrado sobre la actividad del promotor fuese de 2 veces, significa que parte del efecto del HCB sobre la expresión de EM tiene lugar además de a nivel transcripcional por una estabilización de los niveles de RNAm.

Nosotros hemos centrado nuestra atención en los efectos ejercidos por el HCB a nivel transcripcional y más concretamente en el estudio de los elementos en cis y trans que median la respuesta descrita.

Como habíamos mencionado ciertos tóxicos que interactúan con Ahr, como el HCB, TCDD y PCBs, provocan disfunciones en el metabolismo de HT. También se ha publicado que el TCDD aumenta la expresión de c-erb-A (105), sugiriendo posibles interacciones entre Ahr y RT<sub>3</sub>. Estos datos nos llevaron a pensar que siendo el gen de EM principalmente regulado por HT, la inducción observada en ratas intoxicadas con HCB podía estar mediada por dichas hormonas, por lo tanto la posible interferencia del HCB con el mecanismo de acción de las HT fue la primera posibilidad en ser investigada.

Nuestros resultados demostraron que el HCB disminuye los niveles hepáticos de T<sub>3</sub>, lo cual sugiere que la disponibilidad de HT para los receptores nucleares, si bien está disminuida por el fungicida, es suficiente para permitir el aumento en la expresión del gen de la EM. Estos resultados

son compatibles con aquellos reportados por Kleiman y col. (25) los cuales demostraban que el efecto inductor del HCB sobre la actividad de la EM, depende del efecto permisivo de la  $T_3$ . Por otra parte los mismos autores demostraron que el status funcional tiroideo del hígado no se alteraba en presencia de HCB. Los niveles disminuidos de  $T_3$  podrían ser atribuidos a una disminución en la actividad de 5'D, lo cual ocurre a los 15 días de tratamiento, y/o a una incrementada deiodinación de la  $T_3$  sulfoconjugada. Se ha demostrado que la sulfatación facilita una mayor deiodinación (106). Aunque de nuestros datos es imposible decir si el HCB incrementa la sulfatación de  $T_3$ , estudios posteriores permitirán demostrar si la sulfatación de esta hormona es incrementada por este pesticida.

Aunque los niveles de  $T_4$  sérica están disminuidos a ambos tiempos de intoxicación (25) la concentración de  $T_4$  en hígado es normal. Esto podría deberse presumiblemente a: a) un incremento en la entrada de  $T_4$  debido a una fuerte competencia del metabolito más importante del HCB, el pentaclorofenol, con la  $T_4$  por las proteínas séricas transportadoras de tiroxina, con el consecuente incremento de la  $T_4$  libre disponible para entrar a la célula (3), b) una reducida actividad 5 D, con menor conversión de  $T_4$  en  $rT_3$ , c) una reducida actividad 5'D, con menor conversión de  $T_4$  en  $T_3$ . Alguna de estas razones o todas ellas pueden contribuir a mantener los niveles tisulares de  $T_4$  normales a diferentes tiempos de intoxicación.

Nuestros resultados demuestran que el fungicida no afecta la expresión de otras enzimas citosólicas que responden a HT involucradas en otras vías metabólicas tales como la GAPDH, enzima que participa en la glucólisis, la PEPCK, enzima clave en la gluconeogénesis, ni tampoco la expresión de una enzima lipogénica mitocondrial que responde a HT, la  $\alpha$ -GPD. Por lo tanto proponemos que sólo las enzimas citosólicas hepáticas generadoras de NADPH serían específicamente afectadas. Otros autores han demostrado que el TCDD disminuye la actividad de PEPCK en hígado (107) sugiriendo que la regulación de esta enzima por TCDD sería diferente.

Tanto GAPDH como PEPCK y la  $\alpha$ -GPD mitocondrial poseen sitios TRE en sus promotores y se ha demostrado que RT<sub>3</sub> regula la expresión de estos genes uniéndose a dichos elementos de respuesta. Nosotros hemos encontrado que el tratamiento durante 9 días con HCB provocaba una inducción de los complejos proteicos formados sobre TRE. Esto podría deberse a que el HCB induzca una mayor afinidad de RT<sub>3</sub> por el DNA, hipótesis que no parece factible teniendo en cuenta que el pesticida provoca un aumento en los niveles de RNAm de EM pero no de otras enzimas hormono-tiroideo dependientes como PEPCK, GAPDH y  $\alpha$ -GPD. Por lo tanto podría pensarse que no sería RT<sub>3</sub> sino algún cofactor que participe específicamente en la transcripción del gen de la EM, el que

asociándose con  $RT_3$  formara un complejo de mayor afinidad por TRE en presencia de HCB.

Por otro lado, en experimentos de Scatchard hemos demostrado que el HCB no modificaba el número de sitios  $RT_3$  o su afinidad de unión por el ligando. Además los niveles de RNAm de TR $\beta$ 1 (la principal isoforma de  $RT_3$  en hígado) no fueron alterados por HCB lo cual corrobora que no existiría variación del número de sitios de  $RT_3$ , por efecto del pesticida.

Como habíamos mencionado el  $RT_3$  pertenece a la superfamilia de receptores nucleares junto con otros receptores tales como el de ácido retinoico (RAR) y el de 9-cis ácido retinoico (RXRs), Vitamina D (VDR) y receptores esteroideos (72').  $RT_3$  se une a los elementos TRE de los genes diana como un homodímero o un heterodímero con RXR. Ha sido demostrado que la interacción de RXR- $RT_3$  con TRE activa factores de transcripción de la maquinaria basal. Teniendo en cuenta que RXR también forma un heterodímero con RAR, VDR y con receptores huérfanos, la respuesta de la célula a las HT no sólo depende de los niveles de la misma y de los  $RT_3$  sino también de los niveles relativos de RXR y otros receptores nucleares, que compiten con  $RT_3$  para unirse a RXR. En experimentos futuros sería interesante estudiar como son los niveles de RXR y otros receptores que dimericen con  $RT_3$  en ratas intoxicadas con HCB. El hecho de que en ratones "knock out" para Ahr existen cambios en

el metabolismo del ácido retinoico, apoyaría la hipótesis de que tóxicos “tipo dioxina” afectarían los niveles de RXR (108).

Otro factor a considerar es que muchos receptores nucleares tales como  $RT_3$  y RAR, pueden funcionar alternativamente tanto como activadores o represores de la transcripción, dependiendo del contexto celular, de la naturaleza del sitio de unión al DNA y del status hormonal (43). La habilidad de los receptores nucleares para actuar como represores es particularmente evidente para la oncoproteína v-Erb A, un mutante derivado de  $RT_3$ - $\alpha$ . v-Erb A actúa como un represor constitutivo, silenciando genes diana los cuales son normalmente inducidos por ácido retinoico y HT.

Ha sido propuesto que podrían adjudicarse determinadas propiedades transcripcionales a los receptores nucleares de acuerdo a su asociación física con otras proteínas que sirven como coactivadoras o correpresoras. Existe una familia de “factores asociados a  $RT_3$ ” (TRACs) que se asocian físicamente con una variedad de receptores de hormonas nucleares y que modulan sus actividades transcripcionales (109). Un miembro de esta familia TRAC-2 exhibe propiedades de correpresor. Por el contrario, TRAC-1 parece actuar como un antirrepresor. Se propone que la familia TRAC , junto con factores similares juega un importante rol

dictando cual será la respuesta transcripcional mediada por receptores de hormonas nucleares.

Futuros esfuerzos deberán encaminarse al estudio de los niveles de los TRACs en hígado de ratas tratadas con HCB que pudieran modular la actividad transcripcional de RT<sub>3</sub>.

Podemos concluir entonces que el HCB afecta los niveles de RNAm en ratas intoxicadas *in vivo* de manera dependiente de HT. Aunque RT<sub>3</sub> no parece ser responsable por sí mismo del efecto mencionado, su presencia es necesaria para la inducción del RNAm de EM provocada por HCB a través del TRE. Otros factores de transcripción que interactúan con RT<sub>3</sub> podrían estar involucrados en el mecanismo de acción del HCB. Teniendo en cuenta que este pesticida produce un aumento en los niveles de RNAm mucho mayor a los 9 días que a los 15 días de tratamiento, y que a 15 días la inducción de los complejos formados sobre TRE no se observa, podríamos pensar que el “cross-talk” entre factores de transcripción podría estar modificado por HCB de manera diferente de acuerdo al tiempo de intoxicación considerado.

Nuestros resultados indicando que los niveles de RNAm de EM aumentaban también en células de hepatoma de rata y hepatoma humano luego de 24 h del agregado de HCB sugiere la idea de que este aumento ocurre debido a algún cambio en factores de transcripción producidos por la

célula y que no estaría mediado por alteraciones en la concentración de hormonas provenientes de otras células hepáticas u otros tejidos.

## **2. Papel del complejo API**

Matsumura y col. (17) habían demostrado previamente que el TCDD inducía “down regulation” del EGFr, activación de ras, incremento en las proteína tirosina quinasas y proteína quinasa C y que estos efectos eran mediados por Ahr ya que no se observaba en cepas de ratones no susceptibles al TCDD y fueron observados en varios tejidos tales como hígado, timo y tejido adiposo.

Recientemente también se ha demostrado que el HCB afecta la fosforilación de proteínas de membrana microsomal hepática, produciendo un significativo aumento en la actividad de proteínas tirosina quinasas (PTK) a tiempos tempranos de intoxicación (2 días), seguidos de una significativa disminución a los 10 días de intoxicación volviendo a los niveles del control después de 20 días de tratamiento ( 18). Además la administración de HCB luego de 10 días causa una disminución del 50% de los EGFr, sabiendo que este receptor posee actividad de tirosina quinasa podemos explicar la disminución en la actividad PTK observada al mismo tiempo de intoxicación. Estos resultados indican que el HCB afectaría también el camino de señales de transducción de factores de crecimiento.

En el gen de la EM existe un elemento de respuesta a AP1 (38) aunque no se ha comprobado que este elemento sea funcional. En este trabajo mediante estudios de retardo en gel estudiamos la afinidad de unión de este factor de transcripción al elemento de respuesta a AP1 en ratas intoxicadas con HCB y observamos que la afinidad del mismo no variaba significativamente a ambos tiempos de intoxicación. Este resultado coincide con los obtenidos utilizando células de hepatoma transfectadas en forma transitoria con la delección del promotor de EM que comprendía hasta la región -177, zona del promotor que incluye el elemento de respuesta a AP1, en los cuales no se observó estimulación de dicho promotor con HCB. Cuando medimos los niveles de las proteínas Jun y Fos por ensayos de western-blot vimos que tampoco se veían afectados a estos tiempos de intoxicación por lo que concluimos que no sería AP1 el mediador de la estimulación en los niveles de RNAm de EM producida por HCB. Teniendo en cuenta que Jun y Fos activan genes de respuesta temprana, relacionados con la división celular deberían realizarse estudios pocos minutos después de la intoxicación con HCB en cultivos de hepatocitos.

Tomando en consideración que el TCDD induce alteraciones en las proteínas del ciclo celular sería interesante medir los niveles de proteínas involucradas en la proliferación celular y apoptosis, tales como Ras, Raf, c-



Myc, P53 y cdk2 en cultivos de hepatocitos estimulados en forma aguda con HCB.

Los resultados obtenidos por Matsumura y col. en adipocitos en cultivo (110) demuestran un aumento en la unión de AP1 al DNA inducido luego de 15 min. de exposición al TCDD. Estos resultados son diferentes a lo que observamos con HCB dado que no hemos encontrado alteraciones en la unión de AP1 al promotor de EM. Estas diferencias podrían deberse a que en nuestro caso se trata de exposiciones crónicas.

### **3. Papel de PPAR**

En animales intoxicados en forma crónica con HCB se observa un aumento en la concentración de glucosa sanguínea (Randi A., observaciones no publicadas). Este hecho sumado a que existe un aumento de la actividad de enzimas lipogénicas hepáticas como EM, podrían indicar que el HCB ocasionaría un aumento en la concentración de ácidos grasos hepática a semejanza de lo que ocurre con TCDD (111).

Esta sería una situación favorable para que las vías de  $\beta$  y  $\omega$  oxidación estuvieran inducidas lo cual produciría proliferación de peroxisomas. Resultados publicados por Castelain y col. (41) indicaban que PPAR inducía la expresión del gen de EM. Este factor de transcripción actuaría de manera tiromimética pero por un mecanismo

independientemente de las HT. Considerando estos datos publicados previamente en la literatura, decidimos investigar en este trabajo la posibilidad de que el aumento en los niveles de RNAm de EM observados a los 9 y 15 días de intoxicación con IICB estuviera producido por un aumento en la afinidad de unión de PPAR al sitio PPRE presente en el promotor de EM. En los ensayos de retardo en gel no se observaron variaciones en la afinidad de PPAR por el DNA a estos tiempos de intoxicación indicando que este efecto no estaría mediado por el factor PPAR.

#### **4. Papel de la proteína CREB**

Matsumura y col. (24) habían demostrado que había un cambio total en la función adiposa desde lipogénica hasta lipolítica o antilipogénica por efecto del TCDD, y que en este cambio el AMPc y proteínas relacionadas juegan un rol fundamental. La diferenciación de fibroblastos 3T3 L1 en adipocitos se veía bloqueada por una dosis de 5 nM de TCDD y esto se correlacionaba con una inhibición en los niveles de RNAm de la proteína inducida por AMPc, c/EBP  $\alpha$ -, efecto ligado a la presencia de Ahr (112).

Nuestros resultados indicando que la unión de proteínas a la secuencia CRE disminuye notablemente a los 9 días de intoxicación con

HCB coinciden con lo observado para TCDD para otras proteínas inducidas por AMPc como c/EBP  $\alpha$ . En estudios futuros sería interesante medir los niveles hepáticos de C/EBP y AMPc bajo efecto del HCB.

Ha sido descrito que tanto el glucagon como la norepinefrina regulan vía AMPc la expresión del gen de EM actuando a diferentes niveles en distintos tipos celulares. Por ejemplo en cultivos primarios de adipocitos marrones la norepinefrina reduce la vida media de la proteína; en células de tiroides, altos niveles de AMPc produce un incremento a corto plazo y una disminución a largo plazo en los niveles de RNAm de EM. En hepatocitos de pollo se ha reportado una disminución en la vida media del RNAm de EM, así como una inhibición de la transcripción. Por otro lado ha sido demostrado en tejido adiposo marrón que inductores de AMPc como glucagon, forskolina y 8-bromo-AMPc, inhiben fuertemente la expresión basal de EM y la expresión de este gen inducida por HT (113).

Considerando entonces los resultados anteriormente descritos podría pensarse que el AMPc y los factores de transcripción fosforilados por PKA tales como c/EBP y CREB serían inhibidores de la expresión de EM en distintos tejidos. La marcada disminución de la unión de CREB al DNA que encontramos especialmente a los 9 días de intoxicación con HCB, momento en el cual los niveles de RNAm de EM eran más elevados,

podría interpretarse como una liberación de la inhibición producida por CREB sobre la expresión de EM.

### **5. Papel del factor de transcripción Sp1**

Sp1 fue originalmente identificado como una proteína de las células HeLa que se une a múltiples secuencias GGGCGG (caja GC). Los promotores que responden a Sp1 usualmente poseen múltiples cajas GC, aunque un único sitio de unión parece ser suficiente para ser estimulado por Sp1. Además las secuencias de reconocimiento para Sp1 suelen estar cerca de sitios de unión para otros factores de transcripción tales como AP-1 (114), lo cual sugiere que estos factores pueden actuar en conjunción para modular la transcripción, o cerca del sitio de iniciación de la transcripción. En el promotor de EM existen dos secuencias de unión a Sp1, una localizada cerca del sitio de iniciación de la transcripción y otra ubicada dentro de uno de los elementos de respuesta a Insulina (IRE II) (113). Se ha demostrado en experimentos de transfecciones transitorias de células que no expresan este factor de transcripción, que Sp1 es funcional, es decir que participa en la transcripción del gen de EM (Barroso l., observaciones no publicadas), como ya ha sido reportado para otros genes que como el de la EM sus promotores carecen de caja TATA (115). Sp1 por sí mismo no tiene un efecto importante en la transcripción de este gen pero sinergisa con

otros factores de transcripción como PPAR y RXR (Barroso I., observaciones no publicadas). Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito nosotros decidimos estudiar la posibilidad de que Sp1 estuviera involucrado en el mecanismo de acción del HCB. Nuestros resultados mostraron que no existían variaciones en el patrón de bandas de los ensayos de retardo en gel, lo cual indicaría que Sp1 no sería por sí mismo el responsable del incremento en los niveles de RNAm de EM observados en presencia de HCB. Estos resultados nos indicarían también que la Insulina tampoco sería la responsable de dicho incremento, ya que al existir un sitio Sp1 dentro de IRE II, si los niveles de Insulina estuvieran aumentados, por efecto del HCB, deberíamos ver aumentos en Sp1. Por otro lado genes regulados por Insulina (que poseen sitios IRE en sus promotores) como PEPCK y GAPDH no muestran variaciones en los niveles de RNAm. A esto se agrega el hecho de que los niveles de glucosa se encuentran elevados en ratas intoxicadas en forma crónica con HCB (Randi A., observaciones no publicadas), lo cual hace pensar, que es poco factible que la concentración de Insulina esté aumentada y sea responsable del aumento del RNAm de EM ocasionado por HCB. De todas formas los niveles de esta hormona deberían ser medidos por RIA en animales intoxicados.

## **6. Papel de oligonucleótidos de la familia “fork head” en la regulación de EM.**

En este trabajo hemos encontrado que HNF-3 así como otros factores de transcripción de la familia “fork head”, desplazan la unión del complejo inducido, formado sobre TRE a los 9 días de intoxicación con HCB. Es la primera vez que se observa la unión de este tipo de factores de transcripción a elementos de respuesta a HT. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la afinidad de unión de HNF-3 por la secuencia TRE del promotor de EM aumentaba de manera llamativa a los 9 días de tratamiento con HCB *in vivo* y a las 24 h del agregado de HCB a las células de hepatoma. Como hemos descrito anteriormente el potente incremento en los niveles de RNAm de EM observado por efecto del HCB ocurre a esos mismos tiempos de intoxicación por lo tanto una posible explicación sería que un aumento en la afinidad de unión de HNF-3 al promotor de EM induciría un aumento en la transcripción de este gen.

El hecho de que HNF-3 compita solamente con el complejo superior formado sobre TRE indicaría que este es uno entre varios factores de transcripción que participan del complejo que uniéndose a TRE induce la transcripción de EM en presencia de HCB. El sitio de unión al DNA para los HNF es requerido para la expresión específica de genes con alto nivel de expresión en hígado (104). Al ser HNF-3 un factor específico de

hígado podríamos pensar que intervendría en la regulación de la EM hepática en presencia de HCB pero no en otros tejidos como el tejido adiposo marrón donde además fue encontrada una regulación negativa de EM por HCB (116).

Es interesante comentar que haciendo un análisis computacional del promotor de EM hemos encontrado algunas regiones de alta homología con XRE, llamativamente el elemento TRE presenta una homología del 64% con la secuencia consenso XRE. Si dentro de la secuencia TRE de EM estuviera incluido un sitio XRE, otro de los factores de transcripción que podría estar involucrado en la inducción de la transcripción del gen de EM en presencia de HCB podría ser el complejo Ahr.

Sin embargo hasta el momento un aumento en la afinidad de unión de Ahr por la secuencia TRE de EM no ha podido ser demostrada. Estudios posteriores podrán dilucidar si se trata de un XRE funcional que pudiera unir el complejo Ahr bajo ciertas condiciones. Con nuestros resultados no es posible descartar el hecho de que sea un fenómeno independiente de Ahr. Trabajos publicados por Ryv y col. (19) habían demostrado que compuestos como piperonil butóxido y acenaftileno inducían los RNAm del CYP1A2 y CYP1B1 en hígado de ratones “knock out” para Ahr. Estos resultados indicaban que la inducción ocurría por un mecanismo independiente de este receptor. Fue comprobado en células de

hepatoma humano HepG2 que el gen del CYP1A2 posee algunos elementos en cis que regulan su expresión constitutivamente, en forma independiente de Ahr. Uno de estos elementos contiene el sitio de unión para HNF-1, el cual daría especificidad hepática a este CYP. Existen otras dos secuencias con alta homología con XRE en este promotor a través de las cuales tóxicos como 3 - metil colantreno que actúa a través de Ahr regulan este gen. También se ha descrito que otras enzimas detoxificantes como la UDP glucosiltransferasa de rata posee sitios HNF-1  $\alpha$ - es decir que este factor de transcripción regula varios genes con funciones metabolizadoras. Teniendo en cuenta que el HCB es un débil agonista de Ahr, sería interesante investigar la posibilidad de que este efecto sobre EM sea independiente de Ahr. Futuros estudios con ratones "knock out" para Ahr podrían dilucidar cuales de los efectos tóxicos del HCB son mediados por Ahr y cuales son independientes de dicho receptor. Por otro lado es necesario corroborar mediante ensayos de "supershift", utilizando anticuerpos específicos si se trata de HNF-3 u otro factor de transcripción de la familia "fork head" el que se une a la secuencia TRE. Nosotros hemos visto que otros oligonucleótidos de la familia "fork head" compiten la unión de proteínas nucleares al TRE. Incluso obtuvimos competencia con TTF-2, factor de transcripción que se expresa en tiroides pero no en hígado,



indicando que cualquier otro factor con homología estructural por ejemplo por HNF-1 sería capaz de unirse al TRE.

Por otro lado ha sido demostrado que el HNF-3 regula genes que poseen elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en sus promotores como lo son el de PEPCK y CYP7A (117). Nuestros resultados indicando que no existen variaciones en los niveles de RNAm de PEPCK en hígado se contradicen con el aumento en la unión de HNF-3 a su elemento de respuesta observado bajo tratamiento de 9 días con HCB.

Estudios adicionales serían necesarios para dilucidar la compleja regulación de PEPCK en ratas intoxicadas con HCB.

Cabe preguntarse finalmente: ¿cuál sería el significado fisiológico del aumento de la expresión del gen de la EM observado en presencia de HCB?

Una posible explicación sería que el HCB estuviera induciendo la lipogénesis hepática. Ha sido demostrado que el TCDD otro compuesto de las familias de las dioxinas, aumenta la síntesis de ácidos grasos en hígado (111).

Trabajos realizados por Alvarez y col. han indicado que el tratamiento durante 30 días con HCB en tejido adiposo marrón, a diferencia de lo que ocurre en hígado (116), provoca una disminución en la actividad de las EM, G6PD y 6PGD y que también la actividad de la  $\alpha$ -GPD se encontraba

disminuida a diferencia de lo que sucedía en hígado donde los niveles de esta enzima no se encontraban alterados por el pesticida. Esta disminución se observaba aún en ratas tiroidectomizadas o denervadas indicando que el HCB en este tejido actúa por un mecanismo independiente de las HT o del sistema nervioso simpático.

La disminución en la actividad de las enzimas generadoras de NADPH en TAM podría indicar una disminución en la lipogénesis ocasionada por HCB en este tejido, ya que otros autores (111) demostraron también que el TCDD disminuye la síntesis de ácidos grasos en el TAM. Por estudios histológicos de éste tejido proveniente de animales tratados con HCB estos autores encontraron una hipertrofia del mismo, con acumulación de gotas de lípidos, asemejándose su aspecto al de la grasa blanca. Ya había sido demostrado que el TCDD provoca hipertrofia del TAM (111). Estos autores sugieren que este aspecto del TAM indicaría un aumento en los depósitos de triglicéridos del mismo, poco probable por la disminución en las enzimas lipogénicas observada en éste tejido.

Por el contrario nuestros resultados indican que la lipogénesis estaría favorecida en hígado por efecto del pesticida. Teniendo en cuenta que el efecto del HCB sobre las enzimas generadoras de NADPH se observa a tiempos de intoxicación mas cortos en hígado que en TAM

podríamos pensar que el hígado al ser el principal órgano detoxificador del organismo sería el primero en alterar su metabolismo y luego se alteraría el metabolismo en otros tejidos. Los ácidos grasos serían exportados a la sangre como triglicéridos y de esta manera podrían entrar al TAM y acumularse allí, mediados por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL). Esto nos sugeriría un mecanismo más general de acción del HCB a nivel del metabolismo de lípidos.

El NADPH generado en hígado por la EM bajo efecto del HCB podría ser utilizado para otras funciones además de la lipogénesis. Como hemos mencionado anteriormente las dioxinas y otros xenobióticos lipofílicos como el HCB producen un aumento en algunas enzimas de detoxificación hepática tales como las enzimas del CYP así como la inducción de la actividad de glucuronil transferasas. Al ser el hígado el principal órgano de detoxificación del organismo esta hipótesis es también muy factible. Sería interesante verificar si en especies que no manifiestan una inducción de este sistema de citocromos, como el cobayo (118), la EM se encuentra inducida por este pesticida.

# CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se estudió el efecto de la intoxicación de ratas Wistar con HCB sobre el incremento de la actividad de la EM, una de las enzimas directamente involucradas en el proceso de lipogénesis, en función de la regulación de la expresión del gen que la codifica.

Los estudios realizados luego de la intoxicación crónica de ratas con HCB, que produce tan importantes efectos como el desencadenamiento de porfiria (modelo experimental de la porfiria cutánea tarda humana), inducción de enzimas microsomales hepáticas, disfunciones tiroideas, inmunosupresión y carcinogénesis, demostraron por estudios de northern-blot, ensayos de retardo en gel y transfecciones transitorias de células de hepatoma, que el pesticida provoca un incremento en los niveles de RNAm de la EM hepática a los 9 y 15 días de intoxicación y que este efecto era ejercido a nivel de la transcripción de dicho gen.

Por otro lado el estudio de elementos en cis y en trans que pudieran regular la actividad del promotor del gen de la EM como mediadores de su transcripción realizando transfecciones transitorias de células de hepatoma

con construcciones conteniendo diferentes regiones del promotor del EM y ensayos de retardo en gel, indicaron que:

- a) El HCB inducía los complejos protéicos formados sobre el elemento de respuesta a HT (TRE), del promotor del gen de esta enzima.
- b) El elemento TRE, del promotor de la EM, presenta un 64% de homología, con la secuencia consenso del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE).
- c) El receptor de hormonas tiroideas ( $RT_3$ ), no estaría directamente involucrado en la inducción producida por HCB del gen de la EM, aunque su presencia sería necesaria.
- d) En los animales tratados con HCB algún factor de transcripción de la familia “fork head” formaría parte de los complejos protéicos inducidos por el pesticida, que se uniría al elemento TRE.

El significado fisiológico del aumento de la expresión del gen de la EM en presencia de HCB, sería que el pesticida estaría induciendo la lipogénesis

hepática y que el aumento de NADPH, generado en el hígado por el aumento de la actividad de la EM, también podría influir su detoxificación.

Los datos aportados por este trabajo constituyen un importante aporte al conocimiento de la acción molecular temprana, en hígado de ratas, producidas por la intoxicación con HCB en forma crónica y pueden conducir al desarrollo de nuevas líneas de investigación en este campo.

Rodríguez P

Ernesto Sánchez J.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1- Gomez Catalán J., Lezaun M., To-Figueras J. and Corbella J. (1995).  
Organochlorine residues in the adipose tissue of the population of Navarra  
(Spain). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54:534-540
  
- 2- Plaguicidas y Salud en las Américas (1993). Organización Panamericana  
de la Salud. pp. 13-14
  
- 3- Van Raij J.A., Vand den Berg K.J. and Notten W.R. (1991)  
Hexachlorobenzene and its metabolites pentachlorophenol and  
terachlorohydroquinone:interaction with thyroxine binding sites of rat  
thyroid binding sites of rat thyroid hormone carriers *ex vivo* and *in vitro*  
Toxicol. Lett. 59:101-107
  
- 4- Peters H.A., Gocman A., Cripps D.J., Bryan G.T., Dogramaci I. (1982)  
Epidemiology of hexachlorobenzene induced porphyria in Turkey Arch.  
Neurol. 39:744-749
  
- 5- Rozman K., Gorski J.R., Rozman P., Parkinson A. (1986)  
Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene induced  
porphyria. Toxicol. Lett. 30:71



- 6- Linko P., Yeowell H.N., Gasiewicz T.A. and Goldstein J.A. (1986) Induction of cytochrome P-450 isoenzymes by hexachlorobenzene in rats and aromatic hydrocarbons(Ah)-responsive mice. *J. Biochem. Toxicol.* 1:95-107
- 7- Foster W.G., McMahon A., Villeneuve D.C., Jarrell J.F. (1992) Hexachlorobenzene (HCB) suppress circulating progesterone concentrations during the luteal phase in the cynomolgus monkey. *J. Appl. Toxicol.* 12:13-17
- 8- Bourque A.C., Singh A., Lakhanpal N., McMahon A., Foster W.G. (1995) Ultrastructural changes in ovarian follicles of monkeys administered Hexachlorobenzene. *Am. J. Vet. Res.* 56:1673-77
- 9- Rozman K., Gorski J.R., Rozman P., Parkinson A. (1986) Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene induced porphyria. *Toxicol. Lett.* 30:71
- 10- Kleiman de Pisarev D.L., Sancovich H.A., Ferramola de Sancovich A.M. (1989) Enhanced thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-intoxicated rats. *J. Endocrinol. Invest.* 12:767-772

11- Schielen P., Den Besten C., Vos J.G., Van Bladeren P.J., Seinen W., Bloksma N. (1995) Immune effects of hexachlorobenzene in the rat: role of metabolism in a 13-week feeding study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131:37-43

12- Cartew P., Smith A.G. (1994) Pathological mechanism of hepatic tumour formation in rats exposed chronically to dietary hexachlorobenzene. *J. Appl. Toxicol.* 14:447-52

13- Grimalt J.O., Sunyer J., Moreno V., Amaral O.C., Sala M., Rosell A., Anto J.M., Albeiges J. (1994) Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. *Int. J. Cancer* 56:200-203

14- Van Raaij J.A., Kaptein E., Visser T.J., Van den Berg K.J. (1993) Increased glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene-treated rats. *Biochem. Pharmacol.* 45:627-631

15- Henry, E.C. and Gasiewicz, T.A. (1987). Changes in Thyroid hormones and thyroxine glucuronidation in hamsters compared with rats following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 89:165-174

16- Cripps D.J., Peters H.A., Gocmen A. and Dogamaci Y. (1984) Porphyria turcica due to hexachlorobenzene: a 20 to 30 years follow-up study on 204 patients. *Br. J. Dermatol.* 111:413-422

17- Matsumura F. (1994) How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals? *Biochem. Pharmacol.* 48:215-224

18- Randi A.S., Sancovich H.A., Ferramola de Sancovich A.M., Loaiza A., Krawiec L., Kleiman de Pisarev D.L. (1998) Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function. *Toxicology* (in press)

19- Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M., McPhail T., Lee S.S., Kimura S., Nebert D.W., Rudikoff S., Ward J.M., Gonzalez F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268:722-726

20- Antonsson C., Arulampalam Velmurugesan, Whitclaw M.I., Pettersson S., and Poellinger L. (1995) Constitutive function of the Basic Helix-Loop-Helix/PAS factor Arnt. *J. Biol. Chem.* 270:13968-13972

21- Hahn M.E., Goldstein J.A., Linko P. and Gasiewicz T.A. (1989) Interaccion of Hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 270:344-355

22- Ryu D.Y., Levi P., Fernandez Salguero P., Gonzalez F.J. and Hodgson E. (1996) Piperonyl butoxide and acenaphthylene induce cytochrome P450 1A2 and 1B1 mRNA in aromatic hydrocarbon-responsive receptor knock-out mouse liver. *Mol. Pharmacol.* 50:443-446

- 23- Mehmood Z., Williamson M.P., Kelly D.E., Kelly S.L. (1996) Metabolism of organochlorine pesticides: the role of human cytochrome P450 3A4. *Chemosphere* 33:759-69
- 24- Matsumura F. (1995) Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 695S-701S
- 25- Kleiman de Pisarev D.L., Ferramola de Sancovich A.M., Sancovich H.A. (1995) Hepatic indices of thyroid status in rats treated with hexachlorobenzene. *J. Endocrinol. Invest.* 18:271-276
- 26- Roth, W., Voorman R., Aust S.D. (1988). Activity of thyroid hormone-inducible enzymes following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92:65-74.
- 27- Harper H. (1980) Metabolismo de lípidos I y II. En *Manual de Química fisiológica* (Ed. Manuel Moderno, 7º Ed.) pp- 355-397.
- 28- Himms - Hagen J. (1990). Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis: Interdisciplinary studies. *FASEB J.* 4: 2890-2898.

- 29- García-Jimenez C., Hernandez A., Obregón M. J., and Santisteban P. (1993). Malic enzyme gene expression in differentiating brown adipocytes: Regulation by insulin and triiodothyronine. *Endocrinology* 132: 1537-1543
- 30- Ochoa S., Mehler A.H. and Kornberg A. (1948). Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. Isolation and properties of an enzyme from pigeon liver catalyzing the reversible oxidative decarboxylation of L-malic acid. *J. Biol. Chem.* 174:979-1000
- 31- Hsu R.Y. and Lardy H.A. (1967) Pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 242:520-526
- 32- Rutter W.J., Lardy H.A. (1967) Purification and properties of pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 233:374-382
- 33- Magnuson M.A., Morioka H., Tecce M.F. and Nikodem V.M. (1986) Coding nucleotide sequence of rat liver malic enzyme mRNA. *J. Biol. Chem.* 261:1183-1186
- 34- Coleman D.L. and Kuzava J.E. (1991) Genetic regulation of malic enzyme activity in the mouse. *J. Biol. Chem.* 266:21997-22002.

- 35- Magnuson M.A. and Nikodem V.M. (1983) Molecular cloning of a cDNA sequence for rat malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 258:12712-12717
- 36- Morioka H., Magnuson A., Mitsuhashi T., Song M.K., Rall J.E. and Nikodem V.M. (1989) Structural characterization of the rat malic enzyme gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 86:4912-4916
- 37- Usala S.J., Young III W.S., Morioka H. and Nikodem V.M. (1988). The effect of thyroid hormone on the chromatin structure and expression of the malic enzyme gene in hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* 2:619-626
- 38- Petty K.J., Morioka H., Mitsuhashi T., Nikodem V.M. (1989) Thyroid Hormone Regulation of Transcription Factors Involved in Malic Enzyme Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 264:11483-1490
- 39- Morioka H., Tennyson G.E. and Nikodem V.M. (1988) Structural and functional analysis of the rat malic enzyme gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 8:3542-3545

- 40- Petty K., Desvergne B., Mitsuhashi T., Nikodem V.M. (1990) Identification of a thyroid Hormone Response Element in the Malic Enzyme Gene. *J. Biol. Chem.* 265:7395-7400
- 41- Castelein H., Gulick T., Declercq P.E., Mannaerts G.P., Moore D.D., Baes M. (1994) The peroxisome Proliferator Activated. Receptor Regulates Malic Enzyme Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 269:26754-26758
- 42- García Jiménez C., Benito B., Jolin T., Santisteban P. (1994) Insulin Regulation of Malic Enzyme Gene Expression in Rat Liver: Evidence for Nuclear Proteins That Bind to Two Putative Insulin Response Elements. *Mol. Endocrinol.* 1361-1369
- 43- Ribeiro R.C.J., Apriletti J.W., West B.L., Wagner R.L., Fletterick R.J., Schaufele F., Baxter J.D. (1996) The Molecular Biology of Thyroid Hormone Action. *Ann. NY Acad. Sci.* 366-387
- 44- Werner and Ingbor (1996). Intracellular pathways of iodothyronine metabolims. En *The thyroid* (L.E. Braverman and R.D. Utiger, Eds.), 125-161. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.



- 45- Samuels H.H., Forman B.M., Horowitz D.Z. and Ye Z. (1988) Regulation of gene expression by thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 81:957-967
- 46- Moore D.D. and Brent G.A. (1991) Thyroid hormone: half sites and insights. *The new biologist* 3:835-844
- 47- Dozin B., Magnuson M.A. and Nikodem V.M. (1986) Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis. *J. Biol. Chem.* 261:10290-10292
- 48- Dozin B., Magnuson M.A. and Nikodem V.M. (1984) Tissue-specific regulation of two functional malic enzyme mRNAs by triiodothyronine. *Biochemistry.* 24:5581-5586
- 49- Strait K.A., Kinlaw W.B., Mariash C.N. and Oppenheimer J.H. (1989) Kinetics of induction by thyroid hormone of the two hepatic mRNAs coding for cytosolic malic enzyme in the hypothyroid and euthyroid states. *J. Biol. Chem.* 264:19784-19789

50- Schwartz H.L., Forciea M.A., Mariash C.N. and Oppenheimer J.H. (1979) Age related reduction in response of hepatic enzymes to 3,5,3'-triiodothyronine administration. *Endocrinology*. 105:41-46

51- Forciea M.A., Schwartz H.L., Towle H.C., Mariash C.N., Kaiser F.E. and Oppenheimer J.H. (1981). Thyroid hormone-carbohydrate interaction in the rat. *J. Clin. Invest.* 67:1739-1747

52- Goodridge A.G. and Adelman T.G. (1976) Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine, and glucagon in liver cells in culture. *J. Biol. Chem.* 251:3027-3032

53- Back D.W., Wilson S.B., Morris S.M.Jr. and Goodridge A.G. (1986) Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. *J. Biol. Biochem.* 261:12555-12561.

54- Wilson E.J. and McMurray W.C. (1981) Regulation of malic enzyme and mitochondrial  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase by thyroid hormones, insulin, and glucocorticoids in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256:11657-11662

55- Siddiqui U.A., Goldflam T. and Goodridge A. (1981) Nutritional and hormonal regulation of the translatable levels of malic enzyme and albumin mRNAs in avian liver cells in vivo and in culture. *J. Biol. Chem.* 256:18435-18441

56- Mariash C.N., Mcswigan C.R., Towle H.C., Swartz H.L. and Oppenheimer J.H. (1981) Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in the rat hepatocyte culture. *J. Clin. Invest.* 68:1485-1490

57- Dozin B., Rall J.E. and Nikodem V.M.(1986) Tissue-specific control of rat malic enzyme activity and messenger RNA levels by a high carbohydrate diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 83:4705-4709

58- Katsurada A., Iritani N., Fukuda H., Noguchi T., and Tanaka T. (1987) Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 168:487-491

59- Mooradian A.D. and Mariash C.N. (1987) Effects of Insulin and glucose on cultured rat hepatocyte gene expression. *Diabetes* 36:938-943

60- Mariash C.N. and Oppenheimer J. (1983) Stimulation of malic enzyme formation in hepatocyte culture by metabolites: evidence favoring a nonglycolytic metabolite as the proximate induction signal. *Metabolism* 33:545-552

61- Lorenzo M., Fabregat Y. and Benito M. (1989) Hormonal regulation of malic enzyme expression in primary cultures of foetal brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163:341-347

62- Spence J.T. and Pitot H.C. (1982) Induction of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 128:15-20

63- Katsurada A., Iritani N., Fukuda H., Matsumura Y., Noguchi T. and Tanaka, T. (1989) Effects of insulin and fructose on transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme synthesis in diabetic rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1004:103-107

64- Lee S.T., Pineau T., Drago J., Lee E.J., Owens J.W., Kroetz D.L., Fernandez Salguero P.M., Westphal H. and Gonzalez F.J. (1995) Target disruption of the  $\alpha$  Isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15:3015-3022

65- Bogazzi F., Hudson L. and Nikodem V.M. (1994) A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 269:11683-11686

66- Hertz R., Aurbach R., Hashimoto T. and Bar-Tana J. (1991) Thyromimetic effect of peroxisomal proliferators in rat liver. *Biochem. J.* 274:745-751

67- Rehnmark S., Né Chad M., Herron D., Cannon B. and Nedergaard J. (1989)  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. *J. Biol. Chem.* 265:16464-16471

68- Mohell, N. (1984)  $\alpha$  1- adrenergic receptors in brown adipose tissue.

*Acta physiologica Scandinavica*, supp. 530

69- Habener J.F. (1990) Cyclic AMP response element binding proteins:

A cornucopia of transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 4:1087-1094

70- Lotan R.(1980) Effects of vitamin A and its analogues (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta* 605:33-91

71- Sporn M.B. and Roberts A.B. (1984) In *The retinoids*, vol.1.Sporn

M.B., Roberts A.B. and Goodman D.S.eds. (Academic Press,NY) pp.

235-279

72- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895

73- Glass C.K., DiRenzo J., Kurokawa R. and Han Z. (1991) Regulation of gene expression by retinoic acids receptors. *DNA Cell Biol.* 10:623-638

74- Bedó G., Santisteban P. and Aranda A. (1989) Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. *Nature* 339:231-234

75- Lucas P.C., Forman B.M., Samuels H.H. and Granner D.K. (1991) Specific of a retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxikinase gene promoter: consequences of both retinoic acid and thyroid hormone receptor binding. *Mol. Cell. Biol.* 11:5164-5170

76- Song M.H., Grieco D., Rall J.E. and Nikodem V.M. (1989) Thyroid hormone-mediated transcriptional activation of the rat liver malic enzyme gene by dehydroepiandrosterone. *J. Biol. Chem.* 264:18981-18985

77- Song M.H., Dozin B., Grieco D. Rall J.E. and Nikodem V.M. (1988) Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 263:1-5

78- Alexander M., Curtis G., Avruch J., Goodman H.M. (1985) Insulin regulation of protein biosynthesis in differentiated 3T3 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 260:11978-

11985

- 79- Liu X.j, Koski K.G (1997) Maternal dietary glucose modifies phosphoenolpyruvate carboxikinase(PEPCK)gene expression in the kidney of newborn rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 231:187-190
- 80- Brown L.J., MacDonald M.J., Lehn D.A., Moran S.M. (1994) Sequence of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNA. *J. Biol. Chem.* 269:14363-14366
- 81- Desvergne B., Petty K.J. and Nikodem V.M.(1991) Functional characterization and receptor binding studies of the malic enzyme thyroid hormone response element. *J. Biol. Chem.* 266:1008-1013
- 82- De Wet J.R., Wood K.V., De Lucca M., Helinski D.R. and Subramani S. (1987) Firefly luciferase gene:structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*7:725-737
- 83- Gorman C.M., Merlino G.T., Willingham M.C., Pastan I., Howard B.M. (1982). The Rous Sarcoma Virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukariotic cell by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:6777-6781



84- Rodriguez García M., Jolin T., Santos A., Pérez Castillo A. (1995) Effect of perinatal hypothyroidism on developmental regulation of rat pituitary growth hormone and thyrotropin genes. *Endocrinology* 136:4339-4350

85- Morreale de Escobar G., Pastor R., Obregón M.J., Escobar del Rey F. (1985) Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 117:1890-1900

86- Ruiz de Oña C., Obregón M.J., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G. (1988) Development changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effects of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormones. *Pediatr. Res.* 24:588-594

87- Bernal J., Coleoni A.H., DeGroot L. (1978) Triiodothyronine stimulation of nuclear protein synthesis. *Endocrinology* 102:452-457

88- Labarca C., Paigen K. (1980) A simple rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:344-352

89-Scatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. NY Acad. Sci* 51:660-666

90- Chomzynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159

91- Levi A., Eldridge J.D. and Paterson B.M.(1985). Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229:393-395

92- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Molecular cloning. In: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

93- Davis L.G., Dibner M.D. and Battey J.F. (1986) en *Basic methods in Molecular Biology.* Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. NY. pp. 139-142

94- Angel P., Baumann I., Stein B., Delius J., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. (1989). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* 7:2256-2266.

95- Vallejo M., Gosse M.E., Beckman W. and Habener J.F. (1995) Impaired cyclic AMP-dependent phosphorylation renders CREB a repressor of c/EBP-induced transcription of the somatostatin gene in an insulinoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 15:415-424

96- Dynan W.S., Tjian R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35:79-87.

97- Qian X., Samadani U., Porcell A., Costa R.H. (1995) Decreased expression of hepatocyte nuclear factor 3  $\alpha$  during the acute-phase response influences transthyretin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 15:1364-1376

98- Andrews N.C. and Faller D.V. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA binding proteins from limiting numbers of mamalian cells. *Nuclei Acid Res.* 19:2499-2500

99- Gorski K., Carneiro M., Schibler U. (1986) Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell.* 47:767-776

100- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

101- Chen C., Okayama H. (1988) Calcium phosphate-mediated gene tranfer:a highly effiience transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Bio. Technics* 6:632-639

102- Gorman C.M., Moffat L.F., Howard B.H. (1982) Recombinant genomes wich express chloranphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1044-1051

103- Kleiman de Pisarev D.L., Rios de Molina M.C. San Martin de Viale L.C. (1990) Thyroid function and thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria *Biochem. Pharmacol.* 39:817-825

104- Lai E., Clark K.L., Burley S.K. and Darnell Jr. J.E. (1993) Hepatocyte nuclear factor 3/fork head or "winged helix" proteins: A family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10421-10423

105- Bombick D.W., Jankun J., Tullis K. and Matsumura F. (1988) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes increases in expression of c-erb-A and levels of protein-tyrosine kinases in selected tissues of responsive mouse strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4128-4132

106- Rooda S.J.E, Otten M.H., Van Loon A.C., Kaptein E., Visser T.J. (1989) Metabolism of triiodothyronine in rat hepatocytes. *Endocrinology* 125:2187.

107- Stahl B.U. (1995) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks the physiological regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxikinase activity in primary rat hepatocytes. *Toxicology* 103:45-52

108- Andreola F., Fernandez Salguero P.M., Chiantore M.V., Petkovich M.P., Gonzalez F.J. and De Luca L.M. (1997) Aryl Hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* 57:2835-2838

109- Sande S., Privalsky M.L. (1996) Identification of TRACs (T<sub>3</sub> Receptor-Associating Cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of nuclear hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 10:813-825

110- Enan E. and Matsumura F. (1995) Regulation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of the DNA binding activity of transcriptional factors via nuclear protein phosphorylation in guinea pig adipose tissue. *Biochem. Pharmacol.* 8:1199-1206

111- Gorski J.R., Weber L.W.D. and Rozman K. (1988) Tissue-specific alterations of de novo fatty acid synthesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-treated rats. *Arch. Toxicol.* 62:146-151

112- Liu P., Phillips M. and Matsumura F. (1996) Alteration by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin of CCAAT/enhancer binding protein correlates with supression of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Molec. Pharmacol.* 49:989-997

113- García Jimenez C., Hernández A., Obregón M.J. and Santisteban P. (1993) Malic enzyme gene expression in differentiating brown adipocytes:regulation by Insulin and Triiodothyronine. *Endocrinology* 132:1537-1543

114- Mitchell P.J. and Tijian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371-378

115- Krey G., Mahfoudi A., Walhi W. (1995) Functional interaction of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and Sp1 in the transcriptional regulation of the Acyl-Coenzyme-A oxidase promoter. *Mol. Endocrinol.* 9:219-231

116- Alvarez L. (1997). Efecto del hexachlorobenceno sobre la actividad de enzimas lipogénicas en tejido adiposo marrón, pp. 40-43, Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

117- Wang J.C., Strömstedt P.E., O'Brien R.M. and Granner D.K. (1996) Hepatic Nuclear Factor 3 is a accessory factor required for the stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Mol.Endocrinol.* 10:794-800

118- Enan E. and Matsumura F. (1994) Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs. *J. Biochem. Toxicol.* 9:159-170