

Tesis de Posgrado

Mecanismo de acción del hexaclorobenceno sobre la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento en hígado de rata

Randi, Andrea Silvana

1999

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

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

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

Cita tipo APA:

Randi, Andrea Silvana. (1999). Mecanismo de acción del hexaclorobenceno sobre la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento en hígado de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3191_Randi.pdf

Cita tipo Chicago:

Randi, Andrea Silvana. "Mecanismo de acción del hexaclorobenceno sobre la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento en hígado de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3191_Randi.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 de la
Universidad de Buenos Aires

“MECANISMO DE ACCION DEL HEXACLOROBENCENO
SOBRE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES
DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO
EN HIGADO DE RATA”

Autora: Lic. Andrea Silvana Randi

Directora: Dra. Diana Kleiman de Pisarev

Septiembre de 1999

Departamento de Bioquímica Humana,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires,
Buenos Aires, Argentina.



A mis padres, que siempre supieron alentarme y darme cariño.

A mi hija Ailén y a Fernando, a quienes amo profundamente y son el rayito de sol que me guía.

A mis hermanos, Sergio y Roxana, por su amor y porque estamos aprendiendo a caminar juntos por esta vida.

A la memoria de mi padre,

PADRE

Padre, decidme qué,
le han hecho al río
que ya no canta. Resbala con un barbo
muerto bajo un palmo
de espuma blanca. Padre, que el río ya no es el río.
Padre, antes de que vuelva el verano
escarba todo lo que tiene vida.

Padre, decidme qué
le han hecho al bosque
que no hay árboles.
En invierno
no tendremos fuego
ni en verano sitio
donde resguardarnos.
Padre,
que el bosque ya no es el bosque.
Padre, antes de que oscurezca
llenad de vida la despensa.

Sin leña y sin peces, Padre,
tendremos que quemar la barca,
labrar el trigo entre las ruinas, Padre,
y cerrar con tres cerraduras la casa.
Y decía Usted,
Padre,
si no hay pinos,
no se hacen piñones,
ni gusanos ni pájaros.
Padre,
donde no hay flores,
no hay abejas, ni cera ni miel.
Padre,
que el campo, ya no es el campo.
Padre,
mañana del cielo lloverá sangre.
El viento lo canta llorando.

Padre,
ya están aquí.....
Monstruos de carne,
con gusanos de hierro.
Padre, no
no, no tengais miedo,
decid que no, que yo os espero.
Padre,
que están matando la tierra.
Padre,
dejad de llorar,
que nos han declarado la guerra.

Joan Manuel Serrat.

Quiero agradecer profundamente a mi Directora de Tesis, la Dra. Diana Kleiman, por su dedicación y estímulo constante para mi formación científica. A pesar de todos los inconvenientes que acarrea desarrollar un trabajo de investigación en nuestro país, siempre tuvo una actitud positiva, enérgica y emprendedora para sobrellevar los escollos. Además, siempre tuvo un sano concepto de grupo, que nos hizo integrar y ayudarnos mutuamente, así como mantener un ambiente de trabajo cordial. Siempre escuchó mis sugerencias y pude establecer discusiones de igual a igual, sin miedos y con respeto, lo que hizo que trabajara con confianza y pueda crecer de a poco con seguridad.

A mi compañera de laboratorio y amiga Laurita, una persona excepcional,
con un gran corazón y un aguante increíble, espero que sigamos caminando juntas por el difícil rumbo que nos propusimos.

A mis compañeros de laboratorio Ignacio y Rodolfo, a Paula, por los buenos momentos compartidos y el apoyo constante para mantenernos unidos y seguir adelante. A Susana, Marcela y Paulita, por su cariño y su solidaridad en el trabajo y por el apoyo moral en los momentos difíciles.

Al Dr. Horacio Sancovich y a la Dra Ana María Ferramola, a Yolanda, Fernanda y Lilia, por su comprensión, ayuda y colaboración en el trabajo.

Quiero agradecer especialmente a mi compañero Fernando, el amor de mi vida, por su apoyo constante y su fuerza para ayudarme en el camino difícil que es la vida. A nuestra hija Ailén, que es un sol que nos ilumina día a día con sus sonrisas y sus besos y nos enseña a crecer, mejor que cualquier maestro.

A mis amigas del alma, que compartimos buena parte de esta vida, a Silvina, a Andrea y a la Negrita, por sus abrazos y su alegría, porque sigamos ayudándonos y creciendo día a día como personas.

A Fabio y Paula, por su cariño y alegría compartida junto con sus hermosos hijos, Fermín y Emiliano. Por el amor que tienen hacia Ailén, los quiero un montón y siempre me dieron muchas fuerzas.

A mis amigos Marilú y Fernandito, a Gus y Paola, y a Linus, por su afecto y por los lindos días y las noches de canciones, bailes y mates compartidos.

A mis viejas amigas, Marcela y Anita, por su comprensión y calidez.

Me gustaría agradecer a mis padres, que me apoyaron y estimularon en mi carrera y me enseñaron que el amor, la libertad y la dignidad del hombre son cosas por las que debo luchar siempre.

Finalmente, a mis hermanos, Roxana y Sergio, por todo el amor que le dan a Ailén y el cariño que nos une.

INDICE

INDICE

<u>Resumen castellano</u>	I
<u>Resumen inglés</u>	III
<u>Abreviaturas</u>	IV

INTRODUCCION

1- Plaguicidas, ambiente y salud	1
2- Hexaclorobenceno: Usos y patologías	1
Hexaclorobenceno: Biotransformación	3
3- Hormonas tiroideas	5
Metabolismo de las hormonas tiroideas	7
Efecto de inductores de enzimas hepáticas sobre el metabolismo de hormonas tiroideas	8
4- Porfirias	10
Relación entre los efectos sobre las hormonas tiroideas y la producción de porfiria por Hexaclorobenceno	13
5- Receptor de hidrocarburos aromáticos	13
6- Mecanismo de acción de los tóxicos tipo dioxina	15
7- Fosforilación de proteínas	19
Proteínas como moléculas de comunicación	19
Proteínas quinasas: características comunes y diversidad	22
El problema de especificidad de sustrato	24
Fosforilación en tirosina e integridad de organismos multicelulares	25
Extinción de la señal por defosforilación	27
Receptores con actividad de quinasa de tirosina	27
1- Dominios de unión al ligando	29
2- El dominio de transmembrana	29
3- El dominio quinasa de tirosina	29
4- Subdominios del dominio intracelular que regula diversas funciones biológicas	30
5- El RTK dimeriza en respuesta al ligando	31
6- El RTK se acopla a la transducción de señales complejas	34

7- La señal intracelular está mediada por interacciones con proteínas fosforiladas en tirosina	35
8- La expresión inapropiada de los RTKs conduce a diferentes enfermedades incluyendo cáncer	36
La proteína SRC	38
Proteína quinasa C	39
Proteína quinasa C y enfermedad	41
La importancia del camino de quinasas de tirosina en el metabolismo de lípidos de membrana	41
8- Tóxicos tipo dioxina y Factor de Crecimiento Epidérmico	42
Proteínas quinasas marcadoras de exposición a dioxinas	43
¿Entonces, qué significado toxicológico tiene el camino de fosforilación de proteínas ?	43
9- Uso de la medida de la actividad de enzimas de membrana plasmática como marcadores de toxicidad	44
10- Ornitina Decarboxilasa y poliaminas	45
Poliaminas y REGF	49
11- Otros efectos del Hexaclorobenceno	50
12- Relevancia del Trabajo	52
13- Objetivos	53

MATERIALES Y METODOS.

1- Productos utilizados	54
2- Animales y diseño experimental	54
3- Preparación de fracciones subcelulares	55
Microsomas y citosol	55
Membranas plasmáticas	55
4- Determinación de la actividad de ATPasa Na ⁺ /K ⁺ dependiente	56
5- Determinación de la actividad de 5'Nucleotidasa	57
6- Determinación de fosfolípidos endógenos	57
7- Fosforilación in vitro	58
8- Electroforesis en geles de poliácridamida	58
9- Ensayo de unión del [²⁵ I] EGF a sus receptores de membrana	59
10- Inmunoblot para el receptor deEGF	59

11- Inmunoblot para fosfotirosina	60
12- Ensayo de actividad de proteínas quinasas de tirosina	60
13- Determinación de las actividades de Uridín Difosfato	
Glucuroniltransferasas para T ₄ y T ₃	61
14- Determinación de la actividad de Uroporfirinógeno Decarboxilasa	61
15- Determinación de T ₄ y T ₃ séricas	62
16- Actividad de Ornitina Decarboxilasa	62
17- Determinación de poliaminas	63
18- Determinación de proteínas	64
19- Análisis estadísticos	64

RESULTADOS.

CAPITULO I. El Hexaclorobenceno altera las funciones de membrana hepática.

A- Estudios en función del tiempo	65
A1- Cambios bioquímicos de la membrana microsomal hepática	66
A2- Contenido de fosfolípidos	68
A3- Efecto del HCB sobre la fosforilación de proteínas de membrana	75
A4- Efecto del tratamiento con HCB sobre la actividad de quinasas de tirosina	79
A5- La administración de HCB afecta la unión del EGF a sus receptores de membrana hepática	81
B- Cambios dependientes de la dosis de administración de HCB	82
B1- Efecto de la dosis de HCB sobre la actividad de PTKs y de 5' Nucleotidasa	83
B2- El HCB altera la fosforilación de proteínas de manera dosis dependiente	84
En resumen	87

CAPITULO II. Relación dosis-efecto sobre los niveles de receptor de factor de crecimiento epidérmico y contenido en fosfotirosina de proteínas hepáticas. Su relación con la hipotiroxinemia y la porfiria.

A- Efectos de la administración crónica de HCB sobre los pesos corporales y hepáticos, índice hepatosomático y niveles séricos de hormonas tiroideas	88
B- Efecto del HCB sobre la actividad de UDPGTs para T ₄ y T ₃	89
C- Fosforilación in vitro de proteínas hepáticas	91
D- Niveles de receptor de EGF	93
E- Determinación de la actividad de quinasas de tirosina	96
F- Contenido inmunodetectable de fosfotirosina en proteínas endógenas	99
G- Efecto del HCB sobre la actividad de UROD	102
En resumen	102

CAPITULO III. El Hexaclorobenceno induce un aumento en la actividad de Ornitina Decarboxilasa y del contenido de poliaminas libres.

A- Efecto del HCB sobre las actividades de ODC y PTKs y los niveles de poliaminas libres	104
A1- Estudios en función del tiempo	104
a) Ensayos de intoxicación diaria, a 1 y 10 días	104
b) Ensayos a 24 y 48 horas, post-tratamiento de 1 sola dosis	108
A2- Estudios en función de la dosis	
a) La inducción de la actividad de ODC por el HCB es dependiente de la dosis	111
b) La actividad de PKC se incrementa por el tratamiento con HCB	114
B- Efecto del DFMO sobre la actividad de PTKs y su relación con la actividad de ODC y niveles hepáticos de poliaminas	114

DISCUSION.

1- El HCB afecta las funciones de membrana en forma dependiente del tiempo y de la dosis	119
2- El HCB aumenta el índice hepatosomático	119
2- Efecto del HCB sobre los niveles séricos de hormonas tiroideas y la actividad de UDPGTs para T ₄ y T ₃	120

4- HCB y contenido fosfolipídico	122
5- El HCB induce fuertes cambios en la fosfodefósfatación de sustratos endógenos y en la actividad de PTKs	123
5a- Estudios en función del tiempo	124
5b- Estudios en función de la dosis	124
5c- Efecto de la adición de inhibidores de fosfatasa sobre la fosforilación in vitro	126
6- El HCB modifica el comportamiento de los receptores de EGF y el contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas	128
7- El HCB modifica la actividad de quinasas de tirosina hepáticas	131
8- El HCB reduce la actividad de una enzima marcadora de porfiria	132
9- Efecto del HCB sobre la actividad de Ornitina Decarboxilasa hepática y el contenido de poliaminas libres	133
9a- El tratamiento agudo con HCB induce la síntesis de poliaminas	133
9b- El DFMO administrado in vivo, reduce la actividad de PTKs	134
9c- El HCB estimula la actividad de PKC	135
<u>CONCLUSIONES</u>	140
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	141

Resumen

"Mecanismo de acción del hexaclorobenceno sobre la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, en hígado de rata"

Autora: Lic. Andrea Silvana Randi

Directora: Dra Diana Kleiman de Pisarev.

El hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico ambiental ampliamente distribuido en la biósfera. La exposición crónica de animales de laboratorio al HCB, produce porfiria, inducción de enzimas microsomales hepáticas, disfunciones tiroideas, inmunosupresión, cambios en la función reproductiva y en el metabolismo lipídico e inducción de tumores tiroideos y hepáticos.

En este estudio, hemos demostrado que el HCB, administrado a ratas hembras por intubación gástrica, induce cambios en la función de membrana celular hepática, de manera dependiente del tiempo y de la dosis. Nuestros resultados mostraron por primera vez, que la intoxicación crónica con HCB, producía una internalización de los receptores de EGF (REGFs), acompañado de cambios en la actividad de quinasas de tirosina (PTKs) y de alteraciones en el contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas endógenas de membrana y citosólicas. Estas modificaciones ocurrieron desde dosis muy bajas en las que no hay alteraciones en otros parámetros indicativos de toxicidad manifiesta, como porfiria y disminución de T₄ sérica. En un modelo de intoxicación aguda (24 horas post-tratamiento), el HCB aumenta las actividades de Ornitina Decarboxilasa (ODC) y Proteína quinasa C (PKC) dependiente de calcio y fosfolípidos, y el contenido de espermina, y disminuye la actividad de PTKs de membrana. El contenido de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) se incrementó significativamente a las 48 horas posttratamiento. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción del HCB, estaría mediado por la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento.

Palabras claves: hexaclorobenceno, receptor de EGF, fosforilación de proteínas, fosfotirosina, PTK, PKC, ODC, poliaminas.

Abstract

"Mechanism of action of hexachlorobenzene on growth factors receptors signal transduction pathway in rat liver"

-Author: Lic. Andrea Silvana Randi.

- Director: Dra. Diana Kleiman de Pisarev.

Hexachlorobenzene (HCB) is an environmental pollutant widely detected in the environment. Chronical exposure of laboratory animals to HCB elicits a number of effects such as porphyria, microsomal enzyme induction, thyroid dysfunction, immunosuppression, reproductive changes, disruption of lipid metabolism and induction of thyroid adenomas and liver tumors.

In the present study, we have demonstrated that administration of HCB to female rats by gavage, induced time and dose-dependent alterations in the hepatic membrane function. Our results showed that chronic exposure to HCB, induced the internalization of EGF receptors (EGFRs), accompanied by changes in protein tyrosine kinase activities (PTKs) and alterations of phosphotyrosine content of several membrane and cytosolic endogenous proteins. These changes were remarkable at very low doses, that did not induce alterations in other parameters that are biological indicators of HCB exposure, such as induction of porphyria and decreased serum $\bar{T}$ levels. HCB acute treatment (24 hours postintoxication) induced an increase in Ornithine Decarboxylase (ODC) activity and spermine content, as well as induction of calcium and phospholipid dependent Protein Kinase C (PKC) activity, parallel to an inhibition of (PTKs) activities. The polyamines content (putrescine, spermidine and spermine) increased significantly 48 hours after one dose of HCB administration accompanied by an increase of PTKs activities. Our results suggest that HCB mechanism of action could be mediated by growth factors receptors signal transduction pathway.

Key words: hexachlorobenzene, EGF receptor, protein phosphorylation, phosphotyrosine, PTK, PKC, ODC, polyamines.

ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
A-431	línea celular de carcinoma de mama, que sobreexpresa el
REGF	
3-AAP	3-acetamidopropanal
AcCoA	acetil Coenzima A
AcSPD	acetil espermidina
AcSPM	acetil espermina
Ahr ó RHA	receptor de hidrocarburos aromáticos
ALA	ácido aminolevulínico
ALA-S	aminolevulinato sintetasa
5'AMP	5'-monofosfato de adenosina
AMPc	ácido adenosín-3',5'- fosfórico cíclico
AP1	complejo proteico formado por Jun y Fos, factor de transcripción
ARG	arginina
ARNT	proteína transportadora nuclear del receptor Ah
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BSA	seroalbúmina bovina
CAMK II	proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina II
μCi	micro Curies
CK-1	caseína quinasa 1
CK-2	caseína quinasa 2
CRE	elemento de respuesta a AMPc
CYP450	citocromo P-450
DAG	diacilglicerol
DDR	receptor con dominio discoidina
DIT	diiodotironina
DFMO	α- difluoro-metil ornitina, inhibidor de la Ornitina
Decarboxilasa	
DMSO	dimetilsulfóxido
DRE	elemento de respuesta a dioxinas

DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diaminotetra-acético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EM	enzima málca
ERK-1	quinasa regulada extracelularmente-1 (= MAPK)
ERK-2	quinasa regulada extracelularmente-2
ES	error estándar
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
Fos	factor de transcripción, perteneciente a la cascada de transducción de señales de diferenciación y/o crecimiento, gen de respuestatemprana.
FSH	hormona folículo estimulante
GAP	proteína activante de la GTPasa
GAPDH	gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa
GDP	5'- difosfato de guanosina
GMP	5'- monofosfato de guanosina
GMPC	ácido guanosín- 3', 5'-fosfórico cíclico
G6PD	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GRB2	proteína de unión a receptores de factores de crecimiento
GSK	glucógeno sintetasa quinasa
GTP	5'- trifosfato de guanosina
HAP	hidrocarburos aromáticos polihalogenados
HCB	hexaclorobenceno
HHA	hidroxilasas de hidrocarburos aromáticos
HMB	hidroximetilbilano
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSP	proteínas de "heat shock" o de shock térmico
IE	genes de respuesta temprana
IF	inhibidores de fosfatasas
IP ₃	inositol-3-fosfato
IHS	índice hepatosomático
IRS-1	sustrato del receptor de insulina-1
JAK	quinasa Janus
JNK	proteína quinasa activada por amino terminal de Jun

Jun	factor de transcripción, perteneciente a la cascada de transducción de señales de diferenciación y/o crecimiento, gen de respuesta temprana
Kd	kilodalton
LG3PD	L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
LH	hormona luteinizante
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos (= ERK)
MAPKK	quinasa de MAPK (= MEK)
MARCKS	sustrato de quinasa C-rico en alanina miristilada
MEK	quinasa de MAPK (= MAPKK)
MIT	monoiidotironina
MTA	metil-tioadenosina
MW	proteínas marcadoras de peso molecular
Myc	factor de transcripción, perteneciente a la cascada de transducción de señales de diferenciación y/o crecimiento, gen de respuesta temprana
NADPH	nicotinamida adenina difosfato reducida
NBT	azul de nitrotetrazolium
ODC	ornitina decarboxilasa
ORN	ornitina
PA	ácido fosfatídico
PAGE	geles de poliacrilamida
p.c.	peso corporal
PC	fosfatidil colina
PCB	bifenilo policlorado
PCP	pentaclorofenol
PCT	porfiria cutánea tarda
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	fosfatidiletanolamina
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PI	fosfatidil inositol
PI3K	quinasa de fosfatidilinositol-3
PK	proteína quinasa
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato

PS	fosfatidil serina
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PKCa	proteína quinasa C, subfamilia atípica
PKCc	proteína quinasa C, subfamilia convencional
PKCn	proteína quinasa C, subfamilia nueva
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC γ	fosfolipasa C - gamma
PLD	fosfolipasa D
pmol	picomol
PMSF	para metil sulfonil- fluoruro
poli-GT	poli glutámico- tirosina, péptido sintético, sustrato para PTK
PTK	proteína quinasa de tirosina
PTP	proteína fosfatasa de tirosina
put	putrescina
RAF	proteínas quinasas con actividad fosforilante en serina/treonina
RAS	proteína-G pequeña, monomérica, oncoproteína de 21 Kd
REGF	receptor de factor de crecimiento epidérmico
RIA	radio inmunoanálisis
RT ₃	receptor de triiodotironina
RTK	receptor con actividad de quinasa de tirosina
SAM	S-adenosil metionina
SAMDC	S-adenosil metionina decarboxilasa
SAPK	proteína quinasa activada por estrés
SDS	dodecil sulfato de sodio
SH2	dominio homólogo a SRC-2
SH3	dominio homólogo a SRC-3
SHC	proteínas fosforiladas en tirosina, en respuesta al EGF e insulina
SIF	factor inducible por SIS
SOS	proteína intercambiadora de GDP-GTP
SRC	oncoproteína de membrana, no receptora, de 60 Kd,
pp60 ^{src} ,	

	con actividad de quinasa de tirosina
c-SRC	proteína SRC celular
v-SRC	proteína SRC viral
spd	espermidina
SPH	esfingomielina
spn	espermina
STAT91	transductor de señales y activador de la transcripción, de 91
Kd	
STM	buffer sacarosa- Tris- MgCl ₂
T ₃	triiodotironina
T ₄	tiroxina
TAM	tejido adiposo marrón
TBS	buffer Tris- NaCl
TBSTB	buffer Tris- NaCl- seroalbúmina bovina- Tween
TCA	ácido tricloro acético
TCDD	2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina
TCHQ	tetraclorohidroquinona
TCBQ	tetraclorobenzoquinona
TGF- α	factor de crecimiento tumoral- alfa
TK	quinasa de tirosina
TLC	cromatografía en capa delgada
TNF- α	factor de necrosis tumoral- alfa
TPA	12-O- tetradecanoilforbol 13-acetato
TRE	elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TTR	transtiretina, proteína transportadora de hormonas tiroideas
Tris	tri-hidroximetil- aminometano
TSH	tirotrofina
tyr	tirosina
Tyr-K	quinasa de tirosina
UDPGA	ácido uridín difosfo glucurónico
UDPGT	uridín difosfato glucuroniltransferasas
URO-D	uroporfirinógeno decarboxilasa
XRE	elemento de respuesta a xenobióticos

INTRODUCCION

PLAGUICIDAS, AMBIENTE Y SALUD.

Los plaguicidas son productos químicos que se utilizan en la agricultura para combatir plagas, malas hierbas o enfermedades de las plantas. Estos compuestos pueden obtenerse por extracción de productos naturales o ser sintéticos.

De distintos modos y en mayor o menor grado, diferentes grupos y sectores de la población pueden estar expuestos a los plaguicidas. Algunas exposiciones son deliberadas (suicidios u homicidios), mientras que otras son accidentales, como la exposición profesional de personas que preparan, mezclan o aplican plaguicidas, o la exposición no profesional, a partir del agua, del aire o de los alimentos, tanto a corto como a largo plazo (OMS - PNUMA, 1992).

Indicadores biológicos de exposición a los plaguicidas.

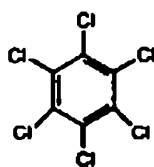
En general, la exposición humana a los plaguicidas se estima midiendo las concentraciones existentes en el medio ambiente (aire, agua y alimentos). En algunos casos, sin embargo, puede obtenerse información sobre las exposiciones analizando la concentración del plaguicida en los tejidos y humores humanos. Esta forma de investigación, denominada vigilancia biológica, resulta especialmente útil en caso de exposición simultánea por distintas vías. La exposición incidental a varios plaguicidas y a sus metabolitos persistentes y no persistentes, puede determinarse analizando el suero, la grasa, la orina, la sangre o la leche.

HEXACLOROBENCENO: Usos y Patologías.

El Hexaclorobenceno (HCB) es un fungicida que fue usado para el tratamiento de semillas (**Figura 1**), especialmente de cereales para combatir *Tilletia foetida* y *Tilletia caries*, así como formando parte de otros fungicidas y herbicidas como contaminante (WHO, 1974). También ha sido utilizado como agente antimicrobiano para preservación de maderas (Courtney, 1979). Actualmente se libera al medio ambiente como subproducto de procesos industriales y de incineración (Brucker-Davis, 1998). Se encuentra ampliamente

distribuido en el medio ambiente, es de alta persistencia, se degrada muy lentamente y se acumula en los tejidos grasos de todos los seres vivos. Diferentes autores en España (Garrido, 1990; De la Riva y Anadón, 1991) y en otros países (Frank y col., 1985; Dogheim y col., 1988; Pinto y col., 1990) han reportado la presencia de HCB en leche y productos de consumo diario. La demostración de un incidente de contaminación del pescado por hexaclorobenceno en Brasil, hace patente la necesidad permanente de reducir las fuentes de contaminación y de vigilar la presencia de dichos plaguicidas en los alimentos de origen animal (OMS-PNUMA, 1992). En un estudio realizado en las aguas del Río de la Plata, por investigadores argentinos y uruguayos, se encontraron cantidades de HCB más altas que los permitidos para la calidad de vida de los organismos acuáticos (CARP, 1989). Recientemente, investigadores santafesinos, observaron trazas de varios pesticidas organoclorados (heptaclorociclohexano, HCB, aldrin, dieldrin, endosulfan y DDT) en leche de vaca pasteurizada para el consumo humano (Maitre y col., 1994), sin embargo, aunque algunos estaban en altas concentraciones, las medias de estos valores fueron menores que el límite de tolerancia dictado por FAO/OMS.

Figura 1.



HCB

Estructura del Hexaclorobenceno.

La Environmental Pollution Agency (EPA, 1984) lo considera un compuesto de toxicidad reconocida, presentando una Dosis Letal 50 (DL₅₀) de 10,000 cuando se administra oralmente a ratas. En un episodio de intoxicación aguda de humanos en Turquía en 1955, 3000 a 4000 personas que habían consumido

granos contaminados con el pesticida, presentaron una serie de signos tóxicos, tales como porfiria y disfunciones tiroideas (Peters y col., 1982; 1987). Luego de 2 o 3 décadas, se registró un aumento de la incidencia de bocio (59 % en mujeres y 23,5 % en hombres) en dicha población, encontrándose elevados metabolitos de porfirinas en orina y niveles de HCB en leche (Peters y col., 1987; Cripps y col., 1984).

Además de los efectos agudos, la administración crónica de HCB produce cáncer en animales de experimentación (International Agency for Research on Cancer, 1978). Estos efectos podrían ser más relevantes que los agudos, debido a que el HCB se presenta a nivel residual en el medio ambiente y se acumula en hígado, tejido adiposo blanco y marrón, grasa periovárica, tiroides y adrenales.

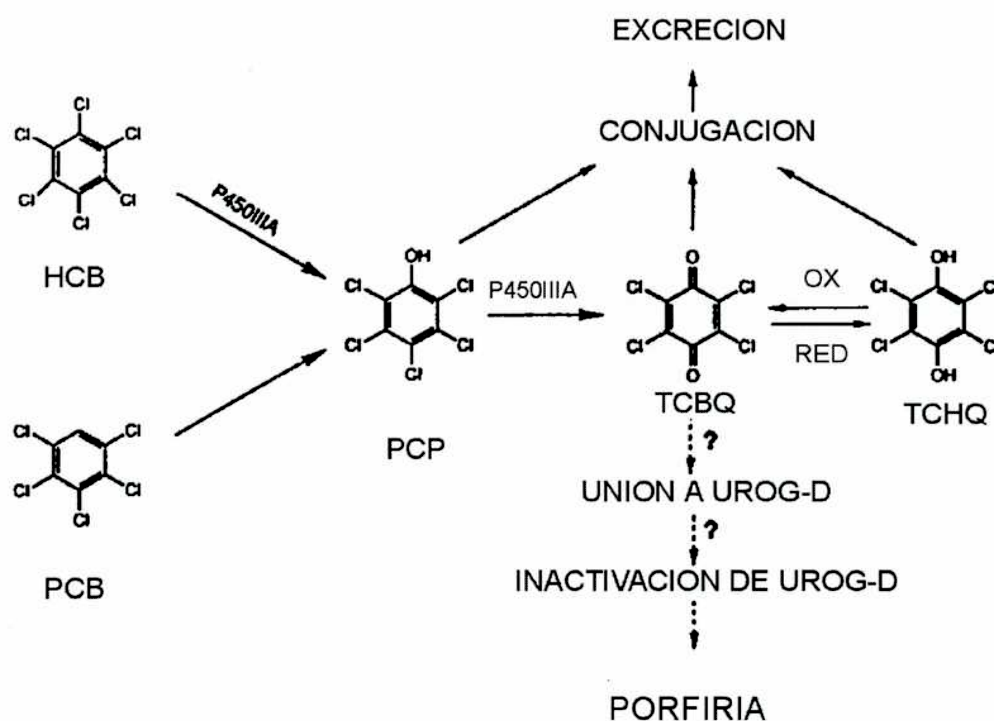
Se ha considerado a los hidrocarburos aromáticos polihalogenados, y dentro de éstos al hexaclorobenceno como "desorganizadores o destructores endócrinos". En 1995, la EPA definió como "desorganizadores o destructores endócrinos", a aquéllos agentes exógenos que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas naturales dentro del organismo, responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de procesos de desarrollo (Kavlock y col., 1996). Esta definición incluye los efectos observados en individuos expuestos y en su descendencia, a través de exposición transgeneracional.

Biotransformación.

Muchos de los efectos tóxicos producidos por HCB requieren de su biotransformación en metabolitos oxidativos como el pentaclorofenol (PCP) y la tetraclorobenzoquinona (TCBQ) o tetraclorohidroquinona (TCHQ) (van Raaij y col., 1993b) (**Figura 2**). El PCP, el principal metabolito del HCB, administrado de forma intraperitoneal a ratas, causa una disminución del 65% en los niveles séricos de T_4 , entre las 6 y las 24 horas; mientras que la TCHQ produce una disminución de la T_3 sérica del 85% luego de 24 horas. Ambos, PCP y TCBQ tienen una alta afinidad de unión a la proteína transportadora de hormonas tiroideas, transtiretina (TTR) (van Raaij y col., 1993b; den Besten y col., 1991).

Parte de los metabolitos aparecen en la orina en forma de glucurónido- PCP o glucurónido- TCHQ (Ahlborg y col., 1974; Ahlborg y col., 1978; Braun y col., 1977). Debets y col. (1980) encontraron que el PCP acelera el desencadenamiento de porfiria producido por HCB, incrementando la excreción de porfirinas urinarias totales.

Figura 2.



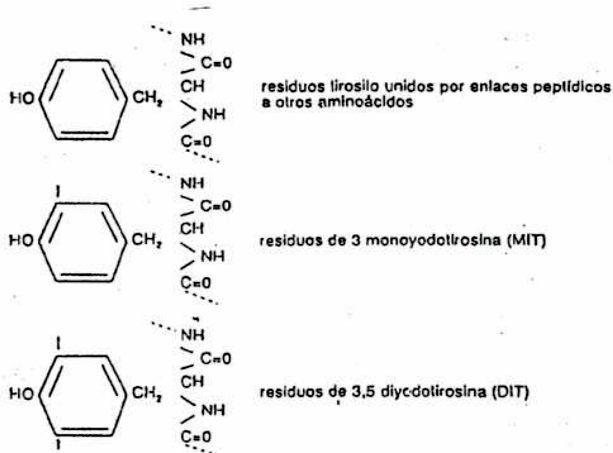
Formación de pentaclorofenol (PCP) y tetraclorobenzoquinona (TCBQ) como metabolitos comunes de HCB y PCB. Rol propuesto de la TCBQ en la inducción de porfiria.

HORMONAS TIROIDEAS.

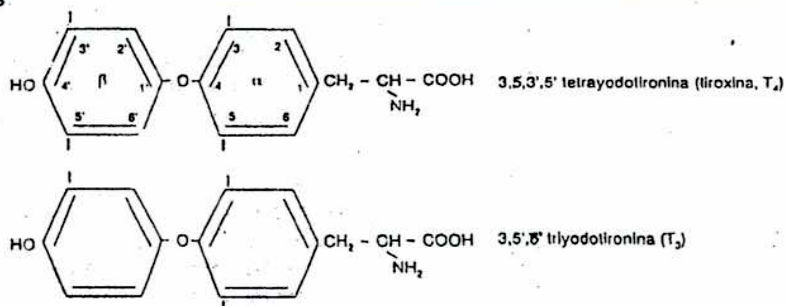
La tiroides es una glándula de secreción interna que cumple importantes funciones en las diferentes etapas de la vida. Durante el período de desarrollo del neonato regula y estimula el crecimiento óseo y neuromuscular (en conjunto con la hormona de crecimiento) y la maduración (mielinización) del sistema nervioso central. En el adulto regula todos los metabolismos y la mayor parte de las funciones de los diferentes órganos y sistemas. Para cumplir con estas funciones, la tiroides produce sus hormonas, la tiroxina o tetraiodotironina (T_4) y la triiodotironina (T_3). Estas hormonas son derivadas de la iodación secuencial del aminoácido tirosina. En la **Figura 3** se muestran las hormonas tiroideas y sus precursores.

Figura 3.

PRECURSORES



HORMONAS TIROIDEAS



Hormonas Tiroideas (T_3 y T_4) y sus precursores.

Las hormonas tiroideas juegan un importante papel en una gran multiplicidad de procesos metabólicos, alterando la concentración y actividad de numerosas enzimas, el metabolismo de sustratos, vitaminas y minerales; la velocidad de secreción y degradación de otras hormonas y la respuesta tisular a las mismas. Algunos de los efectos de las hormonas tiroideas son: a - aumentar la termogénesis, b- inducir en forma general la síntesis de proteínas, por incremento de la transcripción y de la traducción, c - modular la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal y aumentar la captación de glucosa por los tejidos, d- modular la secreción de insulina, e-aumentar la lipólisis en el tejido adiposo y el déficit de hormonas tiroideas disminuye el metabolismo lipídico, con aumento del colesterol circulante y f- regular la maduración del sistema nervioso central. Las acciones celulares no genómicas de las hormonas tiroideas, independientes de los receptores nucleares tradicionales, fueron encontradas en la última década (Davis y Davis, 1998).

Las hormonas tiroideas pueden actuar: 1 - **a nivel nuclear**, modulando la transcripción de genes específicos, 2- **a nivel extranuclear**, ya sea, **mitocondrial**, regulando las oxidaciones, fosforilaciones, síntesis de ARN, proteínas y ATP y **a nivel de la membrana plasmática**, modulando la actividad de ATPasa, el transporte de compuestos, receptores adrenérgicos, etc.

Algunas de las características que distinguen las acciones genómicas de las no genómicas es que en estas últimas hay una actividad dominante de T_4 o T_3 más que de T_3 (Davis y col., 1983; Siegrist-Kaiser y col., 1990) y en algunos casos los efectos son mucho más rápidos, observándose en segundos o minutos (Harris y col., 1991). Las acciones no genómicas pueden también involucrar componentes de caminos de transducción de señales, tales como proteína quinasa C (PKC) dependiente de calcio y fosfolípidos (Lawrence y col., 1989), proteína quinasa A (PKA) (Lin y col., 1996), fosfatos de inositol (Davis y col., 1993) o el complejo calcio-calmodulina (Davis y col., 1983). Además, encontraron que ciertas acciones no nucleares de las hormonas tiroideas parecen ser homeostáticas, como la regulación del contenido intracelular de iones específicos (Baskurt y col., 1990), la compartimentalización de iones

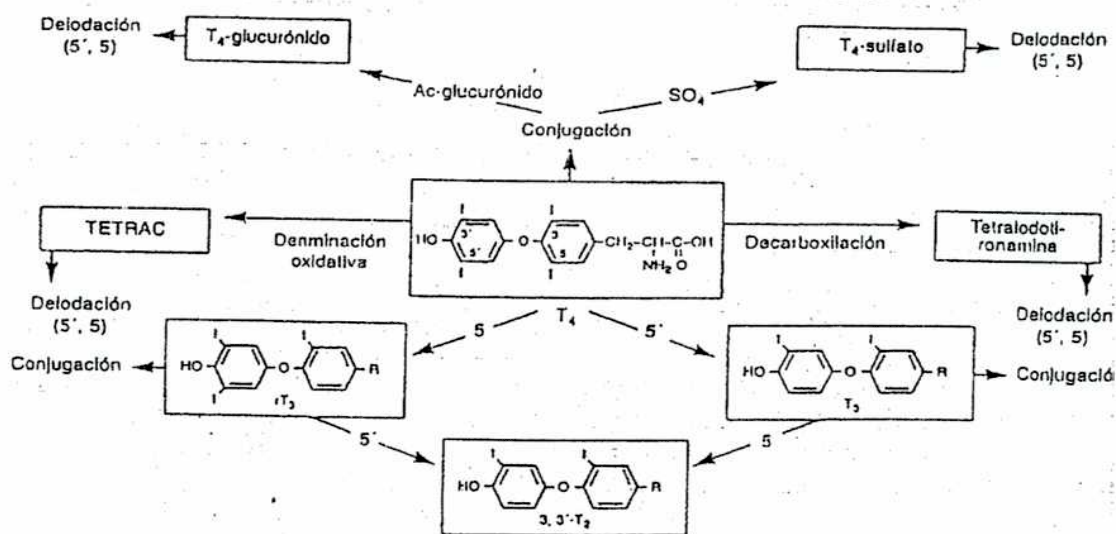
dentro de la célula (Rudinger y col., 1984) o la velocidad de transporte de solutos como la glucosa (Segal e Ingbar, 1979). De todos estos mecanismos, el mejor conocido es el de los receptores nucleares, aunque se han relatado también la posible existencia de receptores en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana plasmática, pero requieren confirmación.

Metabolismo de las hormonas tiroideas.

El metabolismo de las hormonas tiroideas ocurre a través de una variedad de caminos y en diferentes órganos, a saber: deshalogenación, conjugación con sulfatos y glucuronatos, desaminación y decarboxilación (**Figura 4**). En el hombre la vía principal es la deshalogenación secuencial, aunque la conjugación con glucuronatos y sulfatos tiene un rol importante. Las rutas metabólicas de ruptura del enlace éter y desaminación con decarboxilación oxidativa son de menor importancia.

La esterificación de hormonas tiroideas por conjugación con glucuronatos en el hígado, facilita su excreción biliar, siendo una vía importante del metabolismo de hormonas tiroideas. La glucuronidación está mediada principalmente por enzimas microsomales hepáticas con excreción biliar directa (Curran y De Groot, 1991). Sin embargo, hay evidencias de sitios extrahepáticos de glucuronidación, tales como riñón e intestino (Visser y col., 1988).

Figura 4.



Metabolismo de las hormonas tiroideas.

Efecto de inductores de enzimas hepáticas sobre el metabolismo de hormonas tiroideas.

La importancia relevante del hígado en el metabolismo enzimático de sustancias biológicas y xenobióticos ha sido ampliamente reconocida. Debido al rol fundamental del hígado sobre el metabolismo de hormonas tiroideas, no es sorprendente que un número de sustancias químicas sintéticas afecten indirectamente la función tiroidea por aumentar el metabolismo de iodotironinas.

Se identificaron dos grandes sistemas enzimáticos involucrados en la conjugación de iodotironinas, localizados en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos, cuya actividad puede ser inducida por una variedad de xenobióticos. El primer sistema es el de los **citocromos P450** u **oxidasas de función mixta**, una gran familia de enzimas microsomales hepáticas responsables del metabolismo oxidativo de muchos compuestos endógenos y exógenos. Este gran grupo enzimático posee una marcada heterogeneidad de función, aunque frecuentemente exhiben una superposición significativa

de especificidades de sustrato (Nebert y González, 1987). El segundo sistema de enzimas conjuga los productos oxidados por el primer sistema, con el objetivo de facilitar su excreción. Esta función la realizan fundamentalmente las **uridín difosfato glucuroniltransferasas (UDPGTs)** con diferentes actividades y especificidades entre especies y entre diferentes estadios del desarrollo fetal (Dutton y Burchell, 1977). Existen al menos 3 grupos de isoenzimas de UDPGTs responsables del metabolismo de hormonas tiroideas en rata: tipo 1, bilirrubina-UDPGT (produce glucurónidos de bilirrubina, de T₄ y de T₃ reversa) inducida por fibratos; tipo 2, fenol-UDPGT (glucurónidos de fenoles, de T₄ y de T₃ reversa) inducida por metilcolantreno y compuestos tales como los PCBs, dioxinas y HCB; y tipo 3 o androsterona-UDPGT (glucurónidos de androsterona y de T₃) que es poco influenciada por xenobióticos (Visser, y col., 1993; Visser, 1996).

La **glucuronidación** es una reacción biosintética en la cual, un grupo funcional adecuado de la molécula aceptora (sustrato) es conjugado con ácido glucurónico (GA). Esta reacción, procede de acuerdo a la siguiente ecuación:



La conjugación con ácido glucurónico es la responsable de la desactivación y eliminación de diversos tipos de xenobióticos y compuestos endógenos, siendo por ello de importancia en el metabolismo de drogas (y sus metabolitos oxidados), químicos ambientales, carcinógenos, hormonas esteroideas, ácidos biliares y bilirrubina (Miners y Mackenzie, 1991). Esta remarcable versatilidad del proceso de glucuronidación reside en que existe como una familia multigénica.

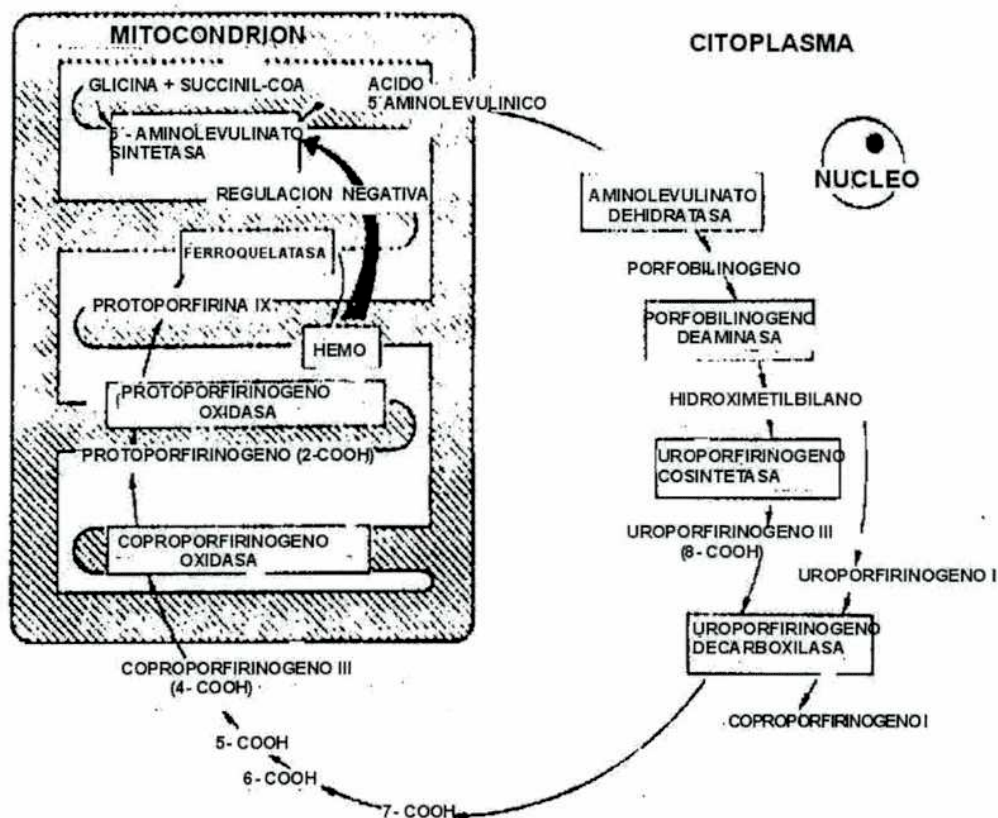
Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que ratas tratadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 30 días, presentaban niveles disminuidos de T₄ sérica, sin alteraciones en los niveles de T₃ y un incremento en los niveles de TSH (Kleiman de Pisarev y col., 1990). El metabolismo periférico de la tiroxina (T₄) (Kleiman de Pisarev y col., 1989) y la deshalogenación hepática de la misma (Kleiman de Pisarev y col., 1990), estaban aumentados

en las ratas intoxicadas. Sin embargo, el estudio de la actividad de enzimas hepáticas hormono-tiroideo dependientes, tales como la enzima málica, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, indicaban que el estatus tisular tiroideo no estaba alterado (Kleiman de Pisarev y col., 1995).

PORFIRIAS.

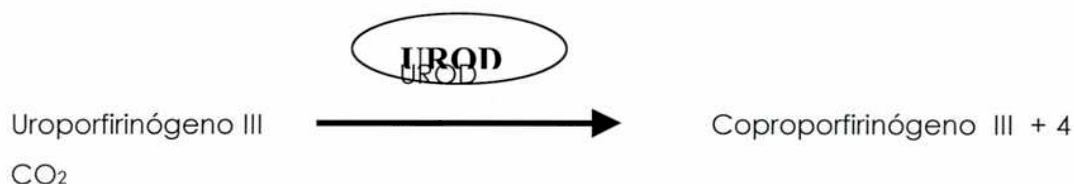
Las porfirias son desórdenes metabólicos originados a partir de defectos en el camino biosintético del hemo (**Figura 5**). Muchas formas son hereditarias autosómicas dominantes, pero algunos tipos son recesivos y otras son adquiridas a través de la exposición a drogas porfirinogénicas y otros químicos. Se pueden clasificar en porfirias agudas y no agudas. En algunas circunstancias, más de una enzima puede estar afectada (Moore, 1993). Como una consecuencia de los defectos enzimáticos, se produce una actividad incrementada de la enzima inicial que regula la velocidad de esta vía biosintética en el hígado: 5 - aminolevulinato sintetasa (ALA-S), con una sobreproducción y una excreción incrementada de porfirinas y/o precursores de porfirinas.

Figura 5.



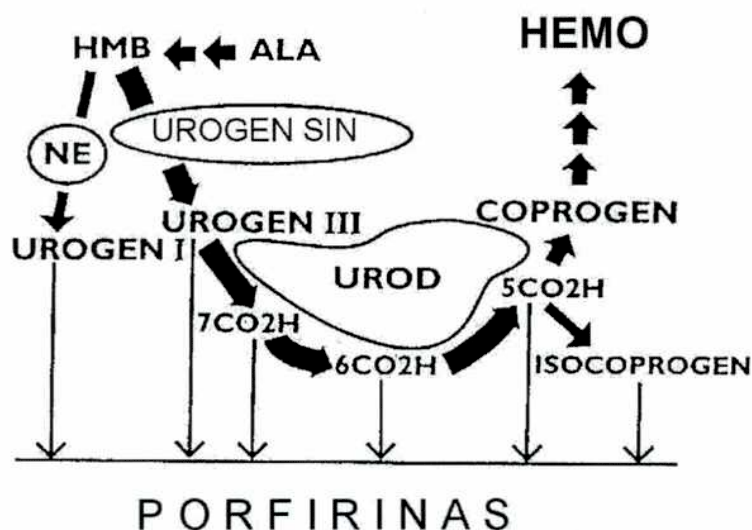
El camino biosintético del hemo, levemente modificado por Moore y col., (1987).

La Porfiria Cutánea Tarda (PCT) puede producirse por exposición a hidrocarburos aromáticos polihalogenados, fundamentalmente a hexaclorobenceno y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, los cuales inactivan a la enzima Uroporfirinógeno Decarboxilasa (UROD) causando porfiria experimental en animales (Sweeney, 1986; Altomare y Capella, 1995). Esta enzima citosólica, la quinta en el camino metabólico del hemo, cataliza la conversión de uroporfirinógeno a coproporfirinógeno por decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales de carboximetilo del uroporfirinógeno, formando intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicas, los cuales sirven como sustratos para la enzima.



Este tipo de porfiria, se caracteriza por la acumulación y excreción de uroporfirinas y porfirinas ácidas heptacarboxílicas (porfirinas altamente carboxiladas), que cuando la enfermedad es severa, se acumulan en la piel, produciendo una grave fotosensibilidad y lesiones cutáneas (Kennedy y Wigfield, 1990) (**Figura 6**).

Figura 6.



Efectos metabólicos de la deficiencia de UROD. Se muestran las reacciones catalizadas por la UROD y la Uroporfirinógeno III sintasa (UROGEN SIN). La actividad disminuida de UROD conduce a la acumulación de sus sustratos y metabolitos. Urogen, coprogen, isocoprogen: uro-, copro- e isocoproproporfirinógeno; 5,6,7 CO₂H: porfirinógenos penta, hexa y heptacarboxílicos; HMB: hidroximetilbilano, EN: ciclización no enzimática.

Los hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAP) inducen a la familia de citocromos P450IA (CYP1A) (Francis y Smith., 1987). En roedores, los citocromos P450IA2 catalizan la oxidación microsomal dependiente de NADPH de

uroporfirinógeno a uroporfirinas (Lambrecht y col., 1992). Un posible mecanismo de inactivación de UROD en hepatocitos, podría ser debido a la alta proporción de productos de oxidación no porfíricos generados en presencia de hierro. En condiciones normales, la proporción de UROGEN III oxidado a uroporfirina y productos de oxidación no porfíricos en presencia de hierro, está aumentada por la inducción del citocromo P4501A2 y por la acumulación intracelular de uroporfirinógeno secundaria a la deficiencia de UROD (Elder, 1998).

Relación entre los efectos sobre las hormonas tiroideas y la producción de porfiria por Hexaclorobenceno.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado, que la T₄ juega un importante rol en la inducción de porfiria (Sopena de Kracoff y col., 1994), sugiriendo que la disminución de T₄ sérica después de la exposición al HCB es un mecanismo compensatorio que lo protege de este efecto. El desencadenamiento de porfiria y de las alteraciones en el metabolismo de hormonas tiroideas son efectos que ocurren a dosis y tiempos diferentes, siendo estos últimos parámetros más sensibles en dosis y tiempo a la exposición al HCB (Kleiman de Pisarev y col., 1989).

RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMATICOS (RHA).

Durante varias décadas, los científicos se preguntaban si dentro del organismo, existían respuestas adaptativas que minimizaran la toxicidad de los contaminantes ambientales. En experimentos con roedores, se encontró que los hidrocarburos aromáticos policíclicos inducían la actividad de un número de enzimas microsomales hepáticas, llamadas en forma general "hidroxilasas de hidrocarburos aromáticos" (HHA) (Conney y col., 1956). Como las enzimas activadas fueron capaces de oxidar a estos compuestos bajo una re-exposición a corto plazo, se pensó que servirían como respuesta adaptativa a dichos tóxicos. El análisis de la región 5' regulatoria del gen del CYP1A1 reveló la existencia de un cierto número de elementos enhancer que responden a dioxinas (DRE), que fueron requeridos para la inducción, y donde se une una

proteína citosólica llamada "receptor de hidrocarburos aromáticos" (RHA) o "receptor Ah" (Ahr) en respuesta al ligando (Denison y col., 1988).

Existirían al menos 2 caminos de transducción de la señal para el AHR: 1 - el camino de la respuesta adaptativa y 2- el camino de la respuesta tóxica. Schmidt y Bradfield, (1996) definen como **respuesta adaptativa**, a la inducción de enzimas que metabolizan xenobióticos, por unión del AHR-ligando al DRE, debido a que dichas enzimas juegan importantes roles en el metabolismo de químicos foráneos, convirtiéndolos en productos de excreción inocuos. Pero, una complicación inesperada de éste sistema de detoxificación, es que transforma a los compuestos inductores en compuestos electrofílicos que pueden combinarse con macromoléculas celulares, conduciendo a funciones celulares alteradas y genotoxicidad.

El camino de **respuesta tóxica**, en cambio, se basa en que muchos efectos mediados por el receptor Ah tienen un impacto negativo sobre el individuo expuesto. Algunos de estos efectos son: promoción de tumores, activación persistente del receptor de hormonas tiroideas, regulación negativa ("down regulation") del receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF), inmunosupresión, inhibición de la gluconeogénesis, teratogénesis/embriotoxicidad, disminución de los niveles séricos de tiroxina, porfiria, señal alterada del receptor de estrógenos, utilización del tejido adiposo marrón, metabolismo lipídico desregulado, disminución del peso corporal, disfunciones cardíacas, etc. Schmidt y Bradfield (1996) plantean la existencia de mecanismos de acción distintos para las respuestas adaptativas y tóxicas.

Sin embargo, los mismos autores, proponen un camino endógeno para el receptor Ah, en que éste podría tener funciones constitutivas o independientes de ligando en procesos biológicos diferentes del que ya conocemos activado por ligando.

MECANISMO DE ACCION DE LOS TOXICOS TIPO DIOXINA.

Los tóxicos "tipo dioxina" incluyen a dibenzo- p-dioxinas polihalogenadas, dibenzofuranos, bifenilos policlorados, naftalenos, azo y azoxybencenos e hidrocarburos aromáticos polihalogenados, los cuales poseen toxicológicamente, propiedades muy similares, siendo la 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo- p-dioxina (TCDD), el compuesto más tóxico de esta familia (Poland y Knutson, 1982; Fisher y col., 1989). Son compuestos extremadamente estables, tanto en el ambiente como en los organismos vivos, lo que los hace persistentes y produce la bioacumulación en la cadena alimentaria. Debido a que son altamente lipofílicos e insolubles en agua, se concentran en los sedimentos de ríos y lagos y son incorporados dentro del tejido graso de peces, aves, reptiles y mamíferos (Birnbaum, 1994).

Las razones más destacadas que llevaron a los científicos a interesarse por el estudio del modo de acción de este grupo de químicos son: a- su alta toxicidad, b- su amplia distribución en los ambientes, c- producen una multiplicidad de efectos tóxicos en diferentes especies de vertebrados, d - las personas tienen una sensibilidad similar a los animales de experimentación para estos tóxicos y e- son buenas pruebas moleculares para el estudio de mecanismos de toxicidad celular.

Según demostró Birnbaum (1994) para la TCDD, los efectos de este tipo de compuestos, pueden agruparse en tres clases de alteraciones (**Tabla 1**): **a- metabólicas**, produciendo cambios en los niveles enzimáticos; **b- en la homeostasis hormonal**, desencadenado por cambios en los niveles hormonales y sus receptores y **c- en el crecimiento y diferenciación** , producidos a partir de cambios en los factores de crecimiento y sus receptores.

Tabla 1.

Efectos biológicos del TCDD (Birnbbaum, 1994).

A- Inducción enzimática → Alteración del metabolismo

- CYP1A1
- CYP1A2
- DT-diaforasa
- UDP-glucuroniltransferasa
- Glutación-S-transferasa
- Aldehído deshidrogenasa
- Ornitina decarboxilasa
- Tirosina quinasa
- Deoxinucleotidiltransferasa terminal
- Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
- Inhibidor del activador de plasminógeno 2

B- Modulación de hormonas y receptores → Homeostasis alterada

- Andrógenos
- Estrógenos
- Receptor de estrógenos
- Glucocorticoides
- Receptor de glucocorticoides
- Insulina
- Gastrina
- Hormonas tiroideas
- Melatonina

C- Modulación de factores de crecimiento y receptores → crecimiento y diferenciación alterados

- Vitamina A
 - EGF
 - TGF α
 - Receptor de EGF
 - TGF β
 - TNF α
 - IL1 β
 - c-Ras
 - c-erbA
-

Los tóxicos tipo dioxina podrían tener dos caminos de acción.

Matsumura (1994) propuso que los tóxicos tipo dioxina, en particular la TCDD, después de su ingreso a la célula a través de la membrana plasmática, se unen al receptor citosólico Ah que forma parte de un complejo junto con las

proteínas de shock térmico (HSP) 90, 70 y 50 y una proteína quinasa de tirosina, la SRC. Seguidamente a esta unión, el dímero Ah-TCDD se separa del resto del complejo y se transloca al núcleo, formando un heterodímero con la proteína translocadora nuclear del receptor Ah (ARNT). Este heterodímero modula la expresión de genes que poseen en sus promotores elementos XRE (elementos que responden a xenobióticos) o DRE (elementos que responden a dioxinas).

La acción más común de todos los químicos "tipo dioxina" es la inducción de enzimas que metabolizan xenobióticos en varios tejidos, particularmente en hígado (Nebert, 1979). El fenómeno de inducción más estudiado ocurre sobre el citocromo P4501A1 (CYP1A1) y en menor medida 1A2. Se ha demostrado, que los genes que codifican para estos citocromos, poseen una secuencia específica en el ADN, 5'- GCGTG - 3' a menudo llamada XRE ó DRE , al cual se une el complejo formado por ARNT y el receptor citosólico Ah unido a su ligando, causando de esta manera la activación de su expresión para producir mayor cantidad de ARNm para la síntesis de la proteína CYP1A1 (**camino 1, Figura7**).

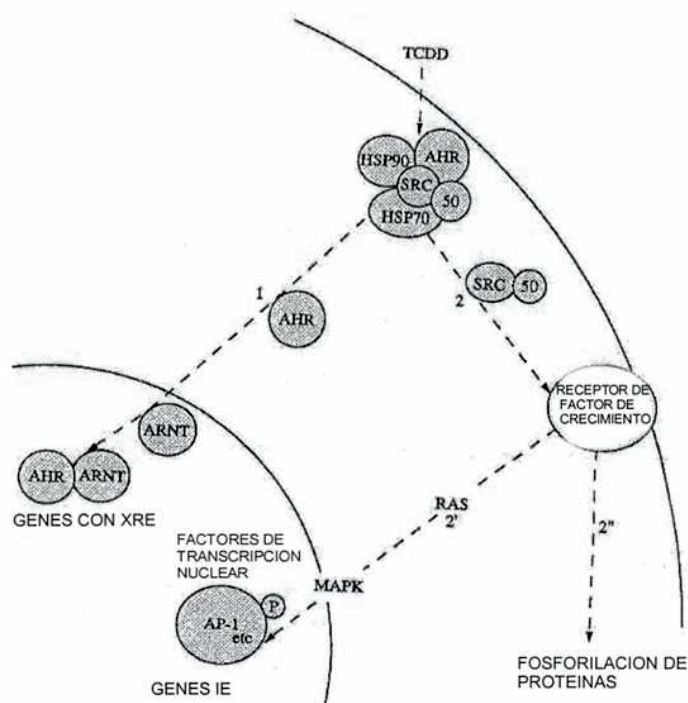
Cuando el receptor Ah se separa del complejo HSP, libera a la proteína SRC activándose su quinasa de tirosina (PTK). La activación de SRC en el citosol, podría desencadenar fosforilaciones directas sobre otras proteínas importantes del citosol, membrana plasmática (receptores de factores de crecimiento) y otras organelas intracelulares para producir cambios funcionales (**camino 2, Figura 7**). La PTK interna de la SRC, podría actuar como desencadenante de la vía de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, a través de RAS y la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que podrían fosforilar factores de transcripción, tales como la proteína activadora - 1 (AP-1). Según Matsumura (1994) ambos caminos 1 y 2, podrían igualmente afectar procesos transcripcionales.

El camino de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, induce respuestas mitogénicas en células, directamente activando a "genes de respuesta temprana". Este mensaje de transducción,

resulta en cambios de la fosforilación de factores transcripcionales nucleares, que son capaces de reaccionar directamente con los genes de respuesta temprana (a veces designados como "immediate early genes" o genes IE), a través de sitios sobre el ADN de respuesta a AP-1 y AP-2, elemento de respuesta a AMPc (CRE), MYC y otros sitios de respuesta sobre regiones promotoras de estos genes, regulando sus expresiones (Herschman, 1991). Así, una vez activada esta vía, no requiere de ninguna interacción de receptor activado por ligando - ADN (por ejemplo interacción TCDD - XRE) para modular la expresión de genes de c-fos, c-jun, jun-D y c-myc (genes de respuesta temprana, codifican para factores de transcripción).

Figura 7.

8



Esquema hipotético del camino de fosforilación de proteínas activado por los tóxicos tipo dioxina. Después de entrar a la célula a través de la membrana plasmática (círculo externo) el tóxico encuentra al complejo del receptor Ah (Ahr) que consiste en proteínas "heat shock" (HSP) 90, 70 y 50, una proteína quinasa de tirosina, SRC y el Ahr. Después de la unión, el receptor Ah unido al tóxico, 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 proteína quinasa interna (**camino 2**), activando al camino de transducción de señales de

factores de crecimiento (**camino 2'**) a través de la activación de la proteína RAS y MAPK produciendo 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 proteínas importantes de la membrana plasmática (por ej. receptores de factores de crecimiento), del citosol y de otras organelas intracelulares (camino 2'') induciendo cambios funcionales.

Por otro lado, está bien estudiado que el receptor Ah también podría fosforilarse cuando se une al TCDD, antes de entrar al núcleo y dimerizar con ARNT. Poellinger y col (1993) demostraron que el receptor Ah defosforilado no puede unirse a ARNT y tampoco es capaz de interactuar con el ADN. También trabajaron con animales tratados *in vivo* con TPA (12-O- tetradecanoilforbol 13-acetato) para regular negativamente a la proteína quinasa C (PKC), y observaron que ,tanto la unión del Ahr-TCDD al ADN como la función del XRE fueron inhibidas, indicando el rol crítico de la fosforilación de proteínas en este marco. Debemos hacer hincapié en el concepto de que el mismo evento de unión al ligando, desencadena la activación de proteínas quinasas, y las candidatas más probables son la pp60 ^{SRC} y la PKC (Matsumura 1994).

El TCDD es un agonista fuerte del receptor Ah, mientras que el HCB al ser un agonista débil (Hahn y col., 1989), podría actuar sobre algunos parámetros celulares, por mecanismos independientes de este receptor, según el tiempo y la dosis de exposición.

FOSFORILACION DE PROTEINAS.

Proteínas como moléculas de comunicación.

Entre los eventos involucrados en la comunicación intracelular, la **fosforilación de proteínas** ocupa una posición central, en la cual éste parece ser el mecanismo más variable y versátil para el cambio del "estado interno" de una proteína de una manera reversible. Por otro lado, la **fosforilación de proteínas** provee el principal código binario para el procesamiento de señales ambientales e intercelulares. Estas señales exógenas están discriminadas por proteínas receptoras, localizadas en la superficie celular o en el citoplasma, las

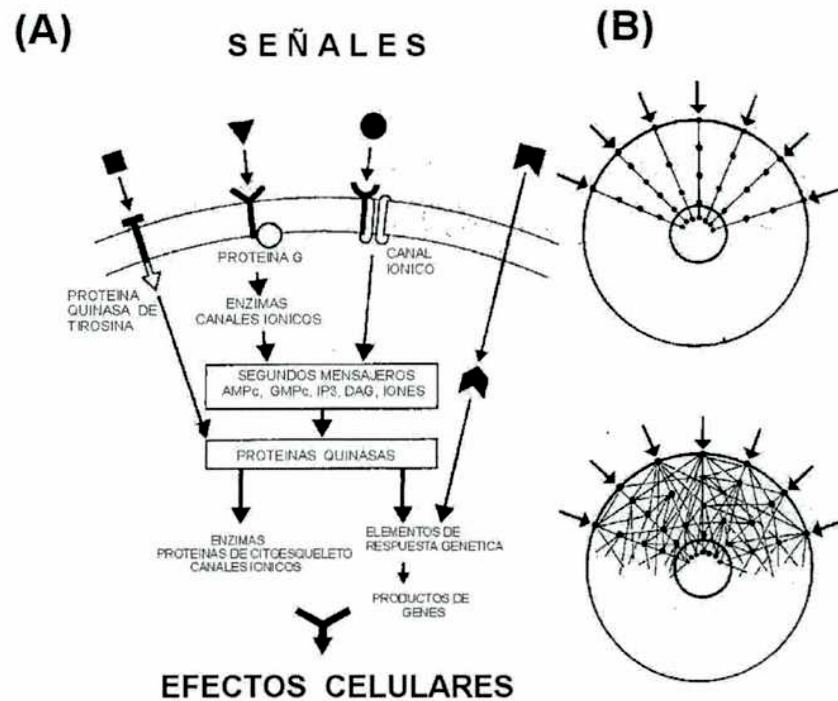
cuales directa o indirectamente modulan la maquinaria intracelular para la fosforilación de proteínas (**Figura 8**).

Las proteínas **transductoras de señales**, están compuestas por lo menos, por dos partes: un módulo receptor para la discriminación de la señal de entrada (dominio regulatorio) y un módulo transmisor para la emisión de la señal de salida (dominio funcional). El ejemplo más estudiado es la proteína G.

Las **moléculas efectoras** están directamente controladas por receptores activados, éstas incluyen enzimas como guanilato ciclasas, proteínas quinasas y GTPasas (proteínas-G), pero también canales iónicos y secuencias genómicas regulatorias. Las moléculas efectoras modulan las señales y las traducen dentro de un lenguaje intracelular de moléculas de señal (los segundos mensajeros) y de interacciones moleculares. Los **segundos mensajeros** controlan la función de otras proteínas efectoras "río abajo", en particular proteínas quinasas, pero también canales iónicos, componentes del citoesqueleto, etc. Algunos representantes bien conocidos son: los nucleótidos cíclicos (AMPC, GMPc), diacilglicerol (DAG), inositol fosfato (IP₃) y Ca²⁺.

La fosforilación conduce a una importante modificación de la estructura de una proteína. El grupo fosfato se une covalentemente a un residuo aminoacídico como serina, treonina y tirosina (unión éster), histidina y lisina (unión amida), cisteína (unión tioéster) o ácido glutámico y ácido aspártico (unión anhídrido mixto). La fosforilación usada con propósitos de señal, ha sido distinguida a partir de la formación de proteínas fosforiladas como estados de transición de corta vida en catálisis enzimática.

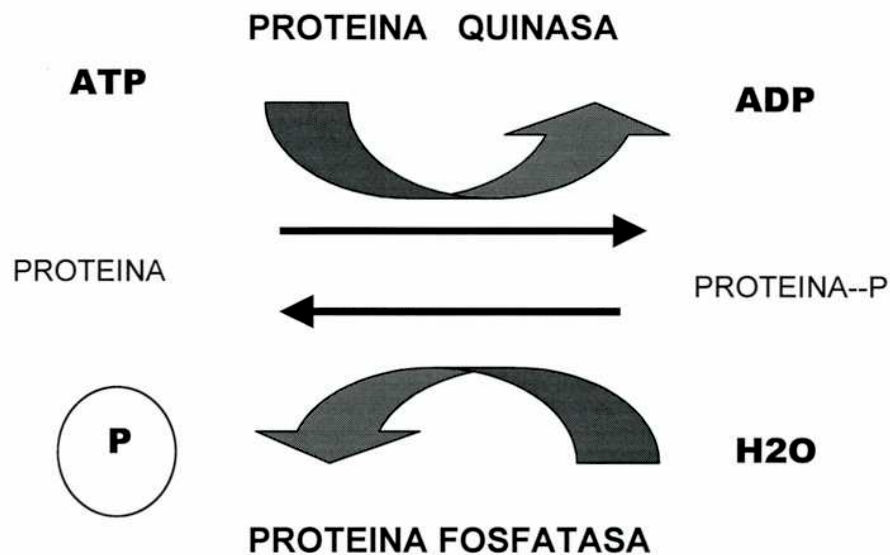
Figura 8.



Camino estándar de transducción de señales celulares. Los receptores activados por una señal son capaces de contactar a moléculas transductoras y/o efectoras tales como quinasas de tirosina, proteínas G, canales iónicos, y secuencias de ADN de genes regulatorios. En ciertos casos, receptor y efector pueden estar localizados en la misma molécula proteica. Las moléculas efectoras modulan la señal de entrada en amplitud y frecuencia y la traducen al lenguaje celular. Estos últimos usan interacciones directas entre proteínas, una variedad de segundos mensajeros y modificaciones covalentes de proteínas, en particular fosforilación. (A) Esquema mostrando ligandos que activan 3 tipos de receptores de membrana, con actividad de quinasa de tirosina, acoplado a proteína G y acoplado a canal iónico y un ligando que activa receptores nucleares. (B) 1- Esquema muy simplificado del A, 2- Como la variabilidad de señales celulares es tan grande, no hay caminos lineales, sino patrones complejos de interacciones de retroalimentación y interconexión entre vías ("cross-talking"), resultando en patrones de excitación difusos.

La fosforilación de proteínas señal, está catalizada por enzimas específicas, las **proteínas quinasas**, y defosforiladas por **proteínas fosfatasas** correspondientes (**Figura 9**). Varios cientos de proteínas quinasas han sido encontradas hasta ahora y se cree que las células eucarióticas pueden expresar más de 1001 proteínas quinasas diferentes (Hunter, 1987). Se ha estimado que, por encima del 5 % del genoma humano podría codificar para proteínas quinasas y fosfatasas (Cohen, 1993).

Figura 9.



Fosforilación de proteínas dependiente de ATP y defosforilación catalizadas por proteínas quinasas y fosfatasas.

Proteínas quinasas: características comunes y diversidad.

Las proteínas quinasas eucarióticas que catalizan la formación de ésteres de fosfato están clasificadas en dos familias: **1- quinasas específicas de serina/treonina** y **2-quinasas específicas de tirosina**. Sin embargo, esta clasificación parece no ser estricta ya que se encontraron enzimas de especificidad dual, para ser/treo y tir como la proteína quinasa activada por mitógenos, MAP-quinasa-quinasa (MAPKK o MEK), un componente de la cascada de señales mitogénica (Auruch y col., 1994; Seger y Krebs, 1995).

Las principales familias de **quinasas de serina/treonina** , son:

- a) proteínas quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (PKA, PKG); b) dependientes de fosfolípidos (familia de PKC); c) reguladas por Ca^{2+} -calmodulina; d) ribosomales S6 (RSK); e) dependientes de ciclinas (cdk, cdc2 - kinasa); f) activadas por mitógenos (MAPK); g) Raf- quinasas; h) caseína quinasa CK2 y glucógeno sintetasa quinasa 3; i) receptores transmembrana (familia del receptor de Factor de Crecimiento Tumoral β ,TGF β /activina); j) receptores serpentina; k) caseína quinasa 1 (CK1); l) quinasas dependientes de ADN (Marks, 1996).

Las familias de **quinasas de tirosina**, han sido divididas en dos subgrupos grandes:

- a) proteínas quinasas de tirosina citoplasmáticas, incluyendo las subfamilias de SRC, Quinasa de SRC celular (CSK), SYK, BTK, Quinasa Janus (JAK), Quinasa de Adhesión Focal (FAK), ABL, y quinasas símil FPS -FES.
- b) proteínas quinasas de tirosina de receptores transmembrana, incluyendo al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), Receptor de Insulina (RI) y subfamilia del RI y quinasas relacionadas (Marks, 1996).

Las "ectoquinasas" son proteínas unidas a membrana con su dominio catalítico del lado extracelular, por ejemplo, la caseína quinasa 1 y 2, que fosforilan tanto sustratos del fluido sanguíneo como proteínas ancladas a membrana, y la PKA que fosforila al péptido atrial natriurético y a las citokinas de Factor de Crecimiento de Fibroblastos b (FGFb) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α) (Vilgrain y Baird, 1991; Skubitz y Gueli, 1991).

¿ Cómo se controla la actividad de las proteínas quinasas ?

Para muchas proteínas quinasas, la regulación de su actividad involucra un mecanismo llamado "**control intraestérico**" (Kemp y Pearson, 1991). Esto es una secuencia peptídica, llamada dominio de pseudosustrato, la cual cubre el sitio activo debido a una analogía estructural con la secuencia consenso de fosforilación del sustrato, excepto que no contiene aminoácidos susceptibles

de fosforilación. Después de la activación de la enzima, la secuencia de pseudosustrato se separa del sitio catalítico, dando acceso a la proteína sustrato. Ejemplos de esto son la **PKC** y la **PKA**. Para muchas otras proteínas quinasas, se necesita la autofosforilación o la fosforilación por otra quinasa separada, para la activación; tal es el caso del **receptor de EGF** o de **insulina**. Otro tipo de mecanismo de control intraestérico, ha sido encontrado para ciertas tirosinas quinasas, por ejemplo de la familia SRC. Aquí la enzima está fija en un estado inactivo, por una interacción intramolecular entre un residuo fosfotirosina del extremo carboxilo terminal y un dominio homólogo al SRC (SH2) y se activa por una defosforilación a partir de una fosfatasa de tirosina, además de una autofosforilación en otro sitio de la enzima.

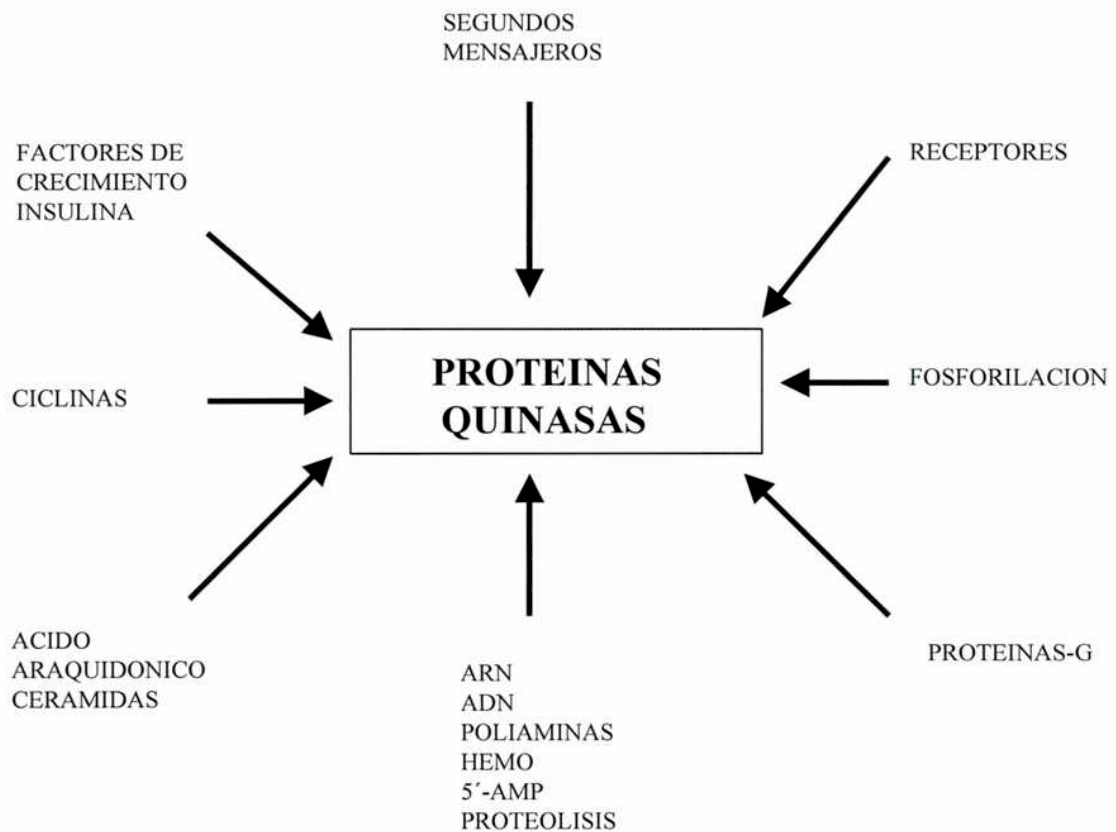
El problema de la especificidad de sustrato.

Muchas proteínas contienen un gran número de supuestos sitios de fosforilación, los cuales pueden ser fosforilados selectivamente por diferentes proteínas quinasas, posiblemente en una secuencia de orden jerárquico. La autofosforilación ocurre en varias quinasas de tirosina y en la proteína quinasa de Ca^{2+} y calmodulina II. Esta reacción, se encontró que constituye un importante paso en la activación enzimática, mientras que para la mayoría de las proteínas quinasas de serina/treonina esta función no ha sido encontrada. Además, muchas proteínas quinasas son sustratos de otras proteínas quinasas. Existen muchos ejemplos indicando este "cross-talk" entre diferentes quinasas, siendo un importante mecanismo regulatorio y un paso crucial en la formación de las redes de procesamiento de señales intracelulares.

La actividad de proteínas quinasas eucarióticas está modulada por una extraordinaria variedad de señales de entrada (**Figura 10**), en particular por receptores y otras proteínas regulatorias, primeros y segundos mensajeros, ácidos nucleicos, y modificaciones covalentes como la fosforilación. Por estos recursos de "cross-talking" de la señal, la red de fosforilación de proteínas está interconectada con otros caminos del procesamiento de la señal intracelular. El ejemplo más simple de acoplar señales extracelulares directamente con la fosforilación de proteínas intracelulares, está ejemplificado por las proteínas

receptoras con actividad intrínseca de quinasa o fosfatasa. Los mejores ejemplos son los **receptores con actividad de quinasa de tirosina (RTKs)**, que son activados por interacciones específicas con varios factores de crecimiento e insulina.

Figura 10.



Proteínas quinasas comoceptoras de varias señales de entrada. El diagrama muestra los factores que regulan la actividad enzimática de diferentes clases de proteínas quinasas. Muchos de estos factores son a su vez controlados por proteínas quinasas y otros compuestos de señal intracelular.

Fosforilación en tirosina e integridad de organismos multicelulares.

Mientras la fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina fue reconocido como una reacción de señal durante los años 1950s, debieron pasar más de 25 años hasta que la fosforilación en tirosina pudiera ser aceptada como una importante modificación post- traduccional. La principal

razón de esta idea, era que las proteínas fosforiladas en tirosina representaban sólo una pequeña porción ($< 1\%$) de todas las fosfoproteínas celulares. La investigación sobre las fosfotirosinas luego recibió un fuerte estímulo cuando se encontró que oncogenes retrovirales, tales como v-src codificaban para proteínas quinasas de tirosina, así como los receptores de factores de crecimiento (Gilwer y Erikson, 1981).

El hecho de que un gran número de mutaciones oncogénicas afecten a quinasas de tirosina, indica que estas enzimas pueden jugar un rol importante en el procesamiento de señales que controlan la integridad de los complejos organismos multicelulares. La fosforilación en tirosina está críticamente involucrada en procesos fisiológicos, los cuales permanecen íntimamente unidos a la multicelularidad, en particular la formación y regeneración de tejidos, homeostasis y vigilancia inmunológica (Marks, 1996).

La evolución de la fosforilación en tirosina viene acompañada de dos nuevos aspectos de la comunicación intramolecular: **a- una reacción de señal y b- un medio para establecer contacto directo entre moléculas proteicas** (Kishimoto y col., 1994). El residuo fosfotirosina es específicamente reconocido por dominios complementarios encontrados sobre otras proteínas, que resultan en una interacción reversible. Este sitio receptor es llamado **dominio SH2** (dominio homólogo al Src, porque en ésta proteína fue descubierto por primera vez). Muchas proteínas transductoras de señal llevan uno o más dominios SH2, las cuales son capaces de comunicarse con proteínas fosforiladas en tirosina. Mientras que los dominios SH2 discriminan entre diferentes residuos de fosfotirosina, sobre la base de parámetros estructurales adyacentes, esta interacción adquiere especificidad y variabilidad, dando así las condiciones ideales para la construcción reversible de los complejos transductores de señal y las redes.

Además de estos dominios, las proteínas también expresan otros sitios de contacto como los **dominios SH3** (Pawson y Schlessinger, 1993) y los **dominios PH** (pleckstrin homology) (Mayer y col., 1993), los que probablemente establezcan interacciones reversibles con proteínas regulatorias, estructuras

del citoesqueleto y de la membrana y con proteínas -G, así como motivos que permiten una unión específica a sitios regulatorios sobre ácidos nucleicos.

Extinción de la señal por defosforilación.

Para una comunicación efectiva, la rápida desaparición de la señal es tan importante como la generación de la misma, pues de lo contrario el sistema quedaría paralizado. En ciertos casos, la desaparición de la señal representa una propiedad intrínseca de la molécula transductora de la señal, como las proteínas G, quienes poseen una inactivación autocatalítica debido a su actividad GTPasa. La señal de fosforilación transducida por proteínas quinasas es cortada por **proteínas fosfatasa**s, las que catalizan el clivaje hidrolítico de la unión fosfomonoéster. Ahora, con los recientes avances en el estudio de las fosfatasa, está claro que para la célula, el control de la defosforilación de proteínas es tan importante y complejo como el control de la fosforilación.

Como en el caso de las proteínas quinasas, podemos distinguir 3 grupos de proteínas fosfatasa eucarióticas: las de serina/treonina, las de tirosina y las fosfatasa duales.

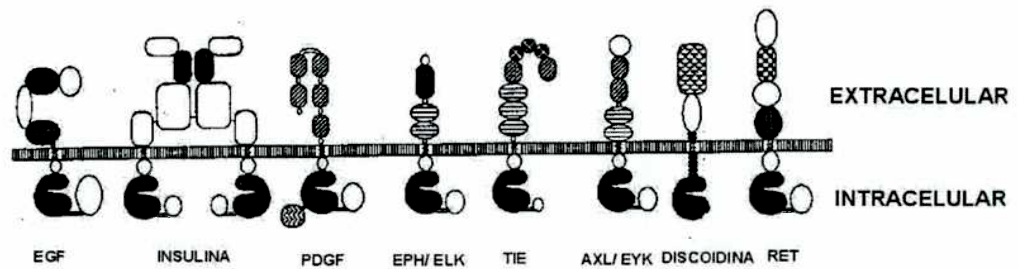
Receptores con actividad de quinasa de tirosina.

Los receptores con actividad de quinasa de tirosina (RTKs), funcionan como un gran grupo de moléculas que propagan las señales ambientales a compartimentos intracelulares para acoplarlos a vías de transducción de señales específicas. Estos receptores son esenciales para el crecimiento normal, el desarrollo y la diferenciación; y han sido clasificados sobre la base de los motivos estructurales encontrados en varios dominios, teniendo en cuenta que los receptores específicos están agrupados dentro de familias (**Figura 11**) (Yarden y Ullrich, 1988).

Los RTKs contienen cuatro dominios funcionales principales: **1- el dominio extracelular**, que une al ligando con alta afinidad y especificidad para proveer una entrada sensorial desde el medio ambiente extracelular; **2- el dominio transmembrana**, formado por aminoácidos hidrofóbicos que

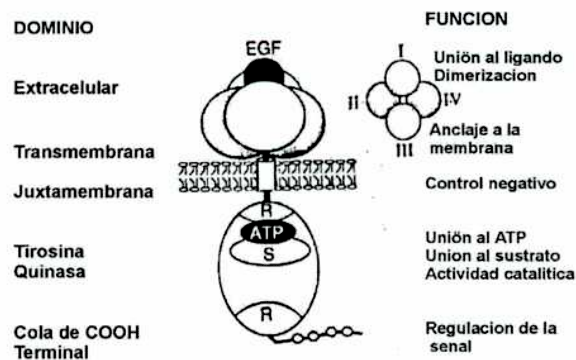
atraviesan la membrana; **3- el dominio quinasa de tirosina citoplasmático**, que contiene la actividad catalítica responsable de mediar las respuestas biológicas y **4- el dominio regulatorio**, que varía según el tipo de receptor: en el carboxilo terminal, o yuxtamembrana (**Figura 12**).

Figura 11.



Motivos estructurales de las diferentes familias de receptores con actividad de quinasa de tirosina (RTKs). Tirosina quinasa, ; quinasa insertada, ; zona rica en cisteína, ; zona similar a inmunoglobulinas, ; unión a fibronectina, ; similar a EGF, ; similar a discoidina, ; zona rica en glicina -prolina, ; similar a cadherina, .

Figura 12



Esquema de la estructura propuesta para el receptor de EGF.

1- Dominios de unión al ligando.

Mucha de la diversidad de los RTKs, se debe a la gran variación en los motivos estructurales, que comprenden al dominio extracelular de unión al ligando. Además, la gran mayoría de los RTKs, poseen ligandos conocidos y desconocidos, con diversidad adicional para generar respuestas biológicas para una multiplicidad de ligandos, que se unen al mismo receptor. Por ejemplo, para el receptor de EGF, sus ligandos deben tener seis cisteínas conservadas, para crear 3 loops mediante puentes disulfuro. El EGF y el TGF- α se mostró que poseen actividad biológica (Prigent y Lemoine, 1992), sugiriendo que los factores de crecimiento son capaces de activar al EGFR vía mecanismos autócrinos o juxtácrinos, mientras permanezcan unidos a la membrana.

2- El dominio de transmembrana.

A pesar de su alta hidrofobicidad y su largo conservado, esta región no mantiene la misma estructura primaria entre los RTKs relacionados. Esto podría deberse a que el segmento transmembrana no juega un rol específico en la transferencia de la señal (Yarden y Ullrich, 1989).

3- El dominio de quinasa de tirosina.

Este dominio es esencial para mediar las respuestas biológicas de los RTKs. Las mutaciones que producen la pérdida de la actividad quinasa de tirosina, están asociadas a la falta de muchas respuestas biológicas (Gill, 1989). Existe una secuencia central o core de 260 aminoácidos que está conservada en toda la gran familia de proteínas quinasas. Dentro de este core de dominio catalítico, se han identificado dos secuencias específicas que distinguen las quinasas de serina/treonina de las quinasas de tirosina.

4- Subdominios del dominio Intracelular que regula diversas funciones biológicas.

Los RTKs contienen varias combinaciones de dominios regulatorios intracelulares. Estos dominios incluyen las regiones de **yuxtamembrana**, **carboxilo terminal** y **de la quinasa**.

Se encontró que éstos, guardan información importante para el funcionamiento normal del receptor, incluyendo los **sitios de autofosforilación en tirosina** para el acoplamiento con proteínas que poseen dominios SH2, **sitios de fosforilación en serina y treonina** para la modulación por proteínas quinasas de serina/treonina, **códigos para endocitosis** y otros códigos de tráfico requeridos para el procesamiento normal y la modulación negativa de los RTKs luego de la unión al ligando.

Luego de la activación por ligando, la proteína más altamente fosforilada en tirosina es el mismo receptor. La función de estos sitios de autofosforilación parece estar primariamente acoplada al camino de transducción de señales o activación de la quinasa de tirosina. En el caso del **receptor de EGF**, cinco sitios de fosforilación residen en el dominio carboxilo terminal. Luego de la autofosforilación, la proteína asume una conformación más abierta, con el objeto de exponer las fosfotirosinas para la interacción con dominios SH2, el código endocítico para interacción con la maquinaria de tráfico intracelular (Cadena y col., 1994). En cambio, la autofosforilación del **receptor de insulina**, parece ser un mecanismo regulatorio del control de la actividad de la TK intrínseca, más que para el acoplamiento de la vía de transducción de señales (White y Khan, 1994).

Sitios para la fosforilación en serina y treonina se han encontrado en forma dispersa, todo a lo largo de los dominios regulatorios. A pesar de que la función de estos sitios no está completamente entendida, se encontró que algunos participan de una **modulación de la señal biológica**. La fosforilación en la treonina 654 del receptor de EGF por la proteína quinasa C, se encontró que disminuye la actividad de la TK del receptor y de esta manera atenúa la señal biológica (Carpenter y Cohen, 1990). La PKC está activada en células

estimuladas con EGF, de esta manera, la fosforilación de este sitio sobre el REGF sirve como un mecanismo de retroalimentación negativa. A pesar de que la función de otros sitios de fosforilación en serina y treonina son desconocidos, es interesante notar que otras quinasas involucradas en señales celulares y en la regulación del ciclo celular, como MAPkinasa (Nortwood y col., 1991) y cdc2kinasa (Kuppuswamy y col, 1993) también fosforilan al receptor de EGF proveyendo una potencial modulación de la señal.

Luego de la unión al ligando, los RTKs sufren una **Internalización inducida por ligando**. Se considera, que la célula utiliza este mecanismo para atenuar la señal. Esta hipótesis se basa en que una delección mutante del REGF tuvo como resultado la pérdida de la capacidad de internalizarse (Chen y col., 1989). El decrecimiento de la internalización de receptores, está acompañado por una disminución en la degradación del ligando (Redy y col, 1994). La información estructural necesaria para el reconocimiento de la maquinaria endocítica, es requerida para el procesamiento del receptor normal y reside en secuencias específicas encontradas en el dominio regulatorio.

El RTK dimeriza en respuesta al ligando.

Después de la unión al ligando, muchos RTKs se dimerizan y agrupan dentro de unas vesículas llamadas "coated pits" (hoyos revestidos de clatrina) como un preludio a su internalización. Este parece ser un importante mecanismo para la activación de la quinasa de tirosina (Yarden y Schlessinger, 1987a). La mayoría de las evidencias, sostienen la hipótesis de que la dimerización funciona como un mecanismo de activación.

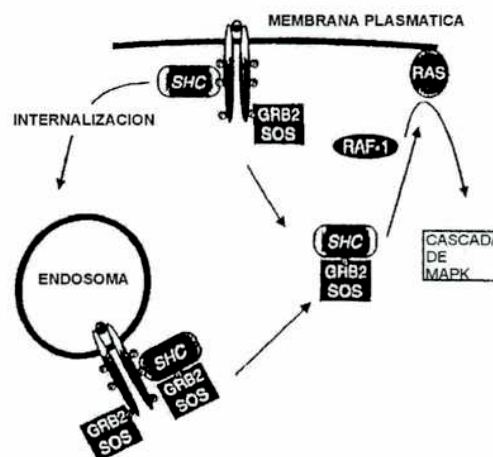
El complejo EGF-EGFR se internaliza y seguidamente entra a endosomas tempranos, cerca de la periferia celular, luego pasan a endosomas tardíos en la región perinuclear y finalmente a lisosomas donde el complejo EGF-EGFR es degradado (**Figura 13**) (Carpenter y Cohen, 1976; Haigler y col., 1979; Willingham y col., 1983). En las células A-431 los receptores de EGF internalizados pueden ser autofosforilados después de los 20 minutos de la unión del EGF a su receptor, mostrando que éste no se disocia

inmediatamente de su receptor luego de la internalización. Las interacciones receptor-receptor continúan y la actividad de TK toma lugar durante algunos minutos después de que el complejo ha desaparecido de la membrana (Sorkin y Carpenter, 1991). Un camino autócrino para la activación del EGFR en las células A-431 ha sido demostrado, donde existe una producción endógena y secreción de TGF- α , el cual se une al receptor de EGF en la superficie, activando sólo al EGFR unido a membrana (Van de Vijver y col., 1991). Se ha reportado que el EGFR es translocado hasta el núcleo por el EGF, donde puede tener efectos directos (Holt y col., 1995). Bandyopadhyay y col., (1998) encontraron que existe una interacción física entre el receptor de EGF y proteínas quinasas nucleares, dependientes de ADN (ADN-PKs) en varios tipos celulares de mamíferos, y que esto podría jugar un rol en la reparación del ADN.

La señal intracelular está mediada por interacciones con proteínas fosforiladas en tirosina.

Algunas de las moléculas implicadas en la transducción de señales que se encontraron, poseen dominios SH2, incluyendo la **Fosfolipasa C-gamma (PLC γ)**, la **Fosfoinositol-3-quinasa (PI3-K)** y proteínas activantes de **GTPasas de Ras (GAP)** (Cantley y col., 1991) (**Figura 14**). Se ha demostrado que la PLC γ , que se une a varios tipos de RTKs, como el del EGF y del PDGF, hidroliza fosfoinositol 4, 5-bisfosfato [PI(4,5)P₂] a inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), y contiene dos dominios SH2 (Rhee y Choi, 1992). La generación de IP₃ resulta en un incremento del calcio citoplasmático.

Figura 13.



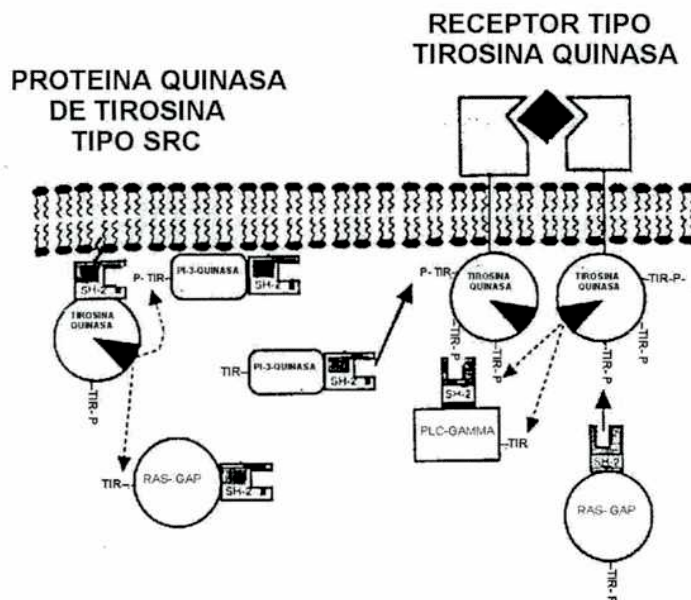
Endocitosis mediada por receptor de complejos ligando-receptor (L-R). El ligando se une a su receptor específico sobre la superficie celular ($t=0$ min), luego el L-R es rápidamente internalizado y aparece secuencialmente en vesículas pequeñas ($t=2$ min), endosomas tempranos (Ens) ($t=5$ min) y Ens tardíos ($t=10$ min). Luego de la disociación, los receptores pueden ser reciclados a la membrana plasmática (insulina) o llevados a lisosomas secundarios para su degradación (EGF). La transducción de la señal sigue ocurriendo cuando el complejo se encuentra en los endosomas.

Los sustratos de todas estas enzimas residen en la membrana, conduciendo a la hipótesis de que la autofosforilación de los RTKs puede servir para mediar la translocación de moléculas específicas hacia la membrana, de esta forma se incrementa la probabilidad de que las enzimas encuentren a sus sustratos. Sin embargo, otros mecanismos como facilitar la interacción del RTK con su sustrato o inducir una conformación más activa de la enzima translocada pueden ser también importantes (Panayotou y Waterfield, 1993).

Aunque los receptores normalmente median la transducción de la señal a través de los sitios de autofosforilación, podrían no requerir la fosfotirosina intrínseca para mediar la señal. Por ejemplo, una delección mutante del REGF en la que son removidos los cinco sitios de autofosforilación, igualmente es capaz de iniciar la proliferación celular (Chen y col., 1989). De esta manera, se cree que existan otras moléculas que funcionan de manera tal de reasegurar la señal.

Otra molécula que contiene sitios SH2 es **SHC**, que diferente a Grb2, éste se fosforila en tirosina en respuesta a EGF (Ruff-Jamison y col., 1993) e insulina (Skolnik y col., 1993). Se ha encontrado que SHC se asocia a Grb2-Sos; por lo que un receptor de EGF mutante sin sitios de autofosforilación podría mediar la fosforilación de SHC y su asociación con Grb2 (Gotoh y col., 1994). Es interesante señalar que SHC es una proteína citosólica que se transloca a la membrana en respuesta al EGF, así esta molécula podría ofrecer un mecanismo alternativo a la autofosforilación o un mecanismo acoplado a la vía de Ras y puede servir para amplificar o modular la señal de entrada desde los RTKs a Ras.

Figura 14.



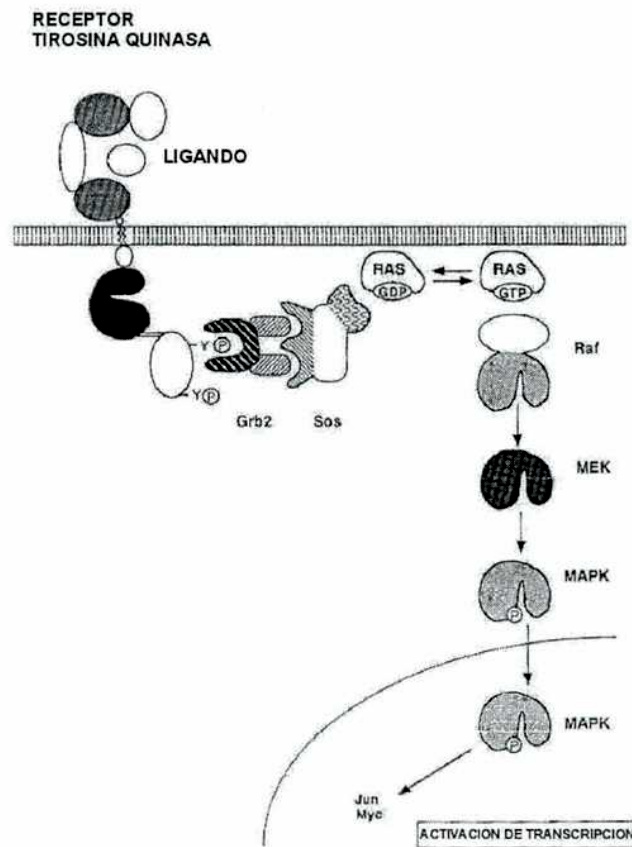
Reclutamiento de enzimas citosólicas con dominios SH2 para PTKs activadas. Los RTKs, luego de la dimerización inducida por ligando, resultaron en una fosforilación cruzada de subunidades sobre residuos tirosina. Los múltiples regiones fosforiladas en tirosina de los receptores proveen sitios de unión específicos para enzimas citosólicas conteniendo dominios SH2. Una vez asociadas, estas proteínas son sustratos para la quinasa de tirosina del receptor.

El RTK se acopla a la transducción de señales complejas.

Los RTKs reciben señales extracelulares y transmiten información apropiada a compartimentos intracelulares. A partir de allí, una variedad de cambios celulares son iniciados, incluyendo transporte de glucosa, incremento en el calcio intracelular, estimulación del recambio de fosoinositidos, incremento en la síntesis de proteínas, activación de genes de respuesta temprana, tales como *fos*, *jun* y *myc* y la iniciación de la síntesis de ADN y la división celular (Yarden y Ullrich, 1988). Muchos RTKs inician respuestas proliferativas por acumular entradas de varias vías de transducción de señales. Para comprender los caminos que median estas respuestas, es necesario analizar

algunas de estas vías de señal que interactúan con los RTKs. Ras está conectada a la vía de **MAPquinasas**, ofreciendo de esta forma a los RTKs, una entrada al camino de transducción de señales hacia el núcleo (**Figura 15**). La MAPkinasa de serina/treonina o ERK1 está estimulada por activación de varios RTKs (Crews y Erikson, 1993). La activación de ésta enzima, requiere ambas fosforilaciones en tirosina y treonina y éstas fosforilaciones son catalizadas por la MAPkinasa kinasa (MAPKK ó MEK).

Figura 15.



Activación del camino de RAS por receptores con actividad de quinasa de tirosina (RTKs). El ligando se une a su receptor y activa su quinasa de tirosina intrínseca. El receptor se autofosforila y de esta manera provee sitios de unión para proteínas que poseen dominios SH2, como la GRB2. El dominio SH3 de GRB2 se une a una región rica en prolina de SOS, la cual tiene actividad de intercambiar nucleótidos de guanina que activa RAS por incremento de la forma unida a GTP. RAS se une a RAF, quien activa a MEK (quinasa quinasa MAP). MEK activa a MAPK (quinasa MAP) por fosforilación en treonina y tirosina. La quinasa MAP se transloca al núcleo, donde activa a factores de transcripción como MYC y JUN.

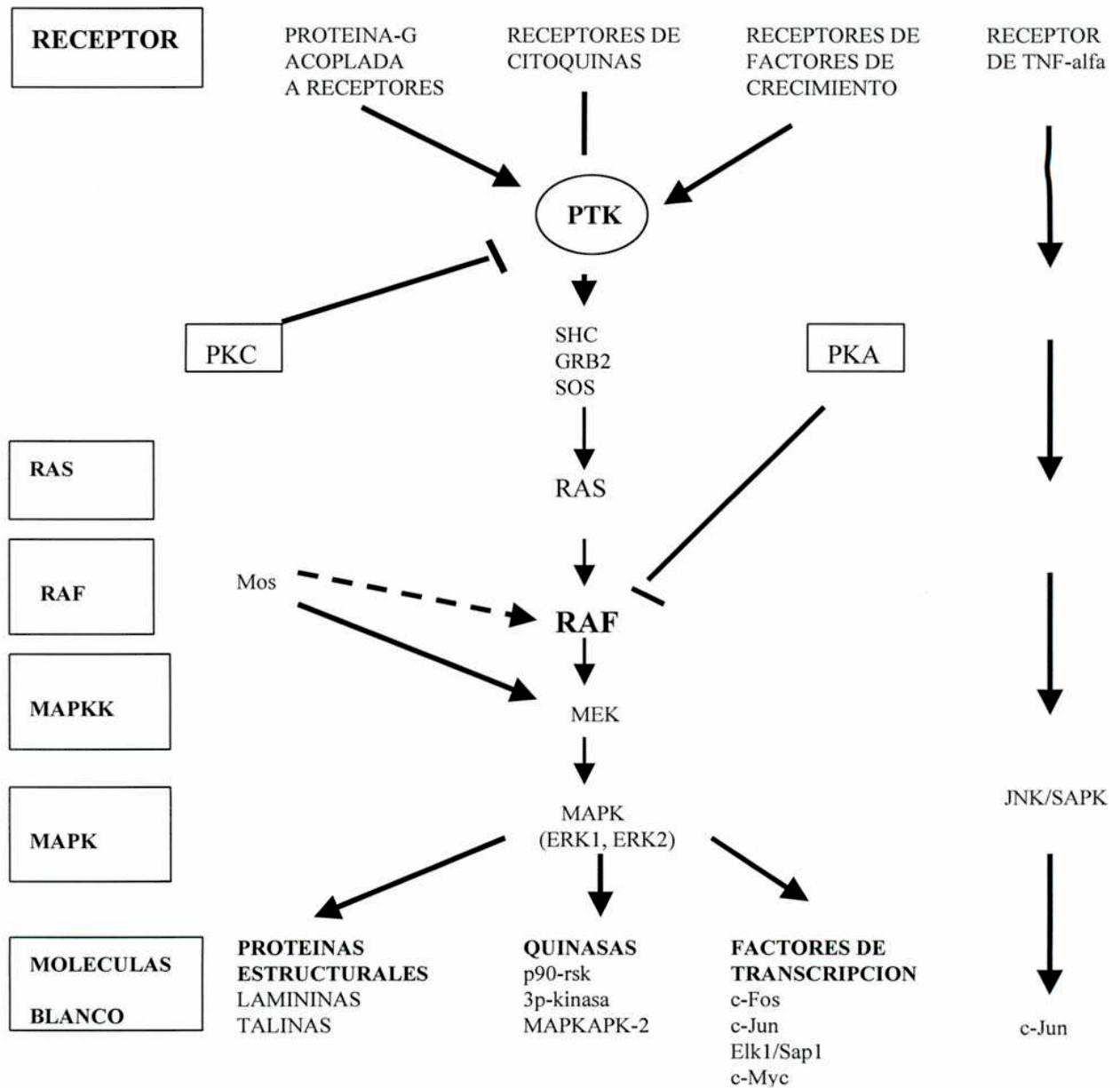
Una activación similar a la de las MAPKKs, se encontró para la kinasa de serina y treonina Raf. Experimentos recientes encontraron que hay una interacción física entre Raf y Ras (Moodie y col., 1993; Hallberg y col., 1994). La información es así transferida por interacciones proteína-proteína y por modificación covalente de proteínas en el núcleo.

Es interesante señalar, que debemos enfocar nuestra atención en la interconexión entre las múltiples vías de transducción de señales (**Figura 16**). Por ejemplo, se sabe que el **AMPc** tiene una gran variedad de efectos sobre la función celular y que el incremento de éste segundo mensajero inhibe la señal para el camino de las MAPquinasas en respuesta a varios ligandos incluyendo EGF, PDGF e insulina (Wu y col., 1993 ; Hordijk y col., 1994).

La expresión inapropiada de los RTKs conduce a diferentes enfermedades incluyendo cáncer.

La potente capacidad de los RTKs para iniciar proliferación requiere de una estricta regulación de su actividad. La ruptura de este control puede llevar a una señal inapropiada, desencadenando diferentes enfermedades, como el cáncer (Aaronson, 1991). Un número de RTKs fueron identificados primero como oncogenes, y muchos de éstos oncogenes fueron generados por mutaciones, los cuales incrementaron su actividad quinasa de tirosina. Por ejemplo, el **oncogen v-erbB** fue identificado como una forma truncada del REGF de pollo, en el cual gran parte del dominio extracelular ha desaparecido. En tumores de cerebro humanos, una mutación común hace desaparecer los exones 2 a 7 que codifican para el dominio externo, resultando en una activación del RTK similar al v-erb B (Nishikawa y col., 1994).

Figura 16.



Interacción de los RTKs con otras señales celulares. RAF es activada luego de la estimulación de una variedad de receptores y juntos con MEK y MAPK, forman la cascada de quinasas citoplasmáticas. MAPK actúa sobre varios blancos los cuales, finalmente determinan importantes funciones celulares. Las flechas indican activación, mientras que las líneas bloqueadas indican inhibición. Las líneas partidas sugieren activación. MEK, proteína quinasa activada por mitógenos; ERK, quinasa regulada extracelularmente; PKA, proteína quinasa dependiente de AMP cíclico; PKC, proteína

quinasa C; JNK/SAPK, proteínas quinasas activadas por estrés/ por amino terminal Jun; TNF, factor de necrosis tumoral.

La proteína SRC.

La pp60^{v-src} es una proteína quinasa de tirosina, que está localizada en la parte interna de la membrana plasmática y de otras membranas intracelulares y representa el prototipo de las quinasas de tirosina no receptoras. Se considera que interviene en el camino de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento. La proteína SRC celular está expresada ampliamente, principalmente en cerebro, plaquetas y células epiteliales. La función de la activación de la SRC todavía no se conoce, pero durante la mitosis, se localizan en el centro organizador de microtúbulos celular, indicando que podría tener un rol en la estructura del citoesqueleto durante esta fase del ciclo celular (Shalloway y Shenoy, 1990). El hecho de que la SRC haya sido encontrada como el producto de un oncogen, indica que ésta tiene un rol en el control del crecimiento. De esta manera, se encontró que la actividad de kinasa de la SRC se incrementó con la adición de PDGF a las células (Ralston y Bishop, 1985).

Otras fosfotirosina-proteínas, la p110 y la p130 se fosforilan en células transformadas por SRC (Kanner y col., 1991) y forman complejos con pp60^{src} de manera dependiente de SH2. Análisis inmunológicos revelaron que la p130 es una proteína altamente fosforilada en tirosina durante la transformación por pp60^{v-src} (v-Src) tanto como por v-Crk, formando complejos estables con estas oncoproteínas. Además, estudios de fraccionamiento subcelular, mostraron que la p130 citoplasmática podría moverse hacia la membrana una vez que se fosforiló en tirosina, de esta manera tendría un rol en la transducción de señales de fosfotirosina, agrupando las señales de múltiples moléculas que contienen SH2 (Ryuichi Sakai y col., 1994).

PROTEÍNA QUINASA C.

Las enzimas de la familia PKC son proteínas transductoras de señales. Estas moléculas están formadas por un dominio amino terminal receptor para la señal de entrada (dominio regulatorio) y un dominio carboxilo terminal, transmisor de la señal de salida (dominio catalítico), ambos localizados en la misma cadena polipeptídica. Mientras el dominio catalítico está altamente conservado a lo largo de las diferentes isoenzimas y presenta una fuerte homología a los dominios catalíticos de otras proteínas quinasas, el dominio regulatorio exhibe un alto grado de variabilidad (Marks y Gschwendt, 1996).

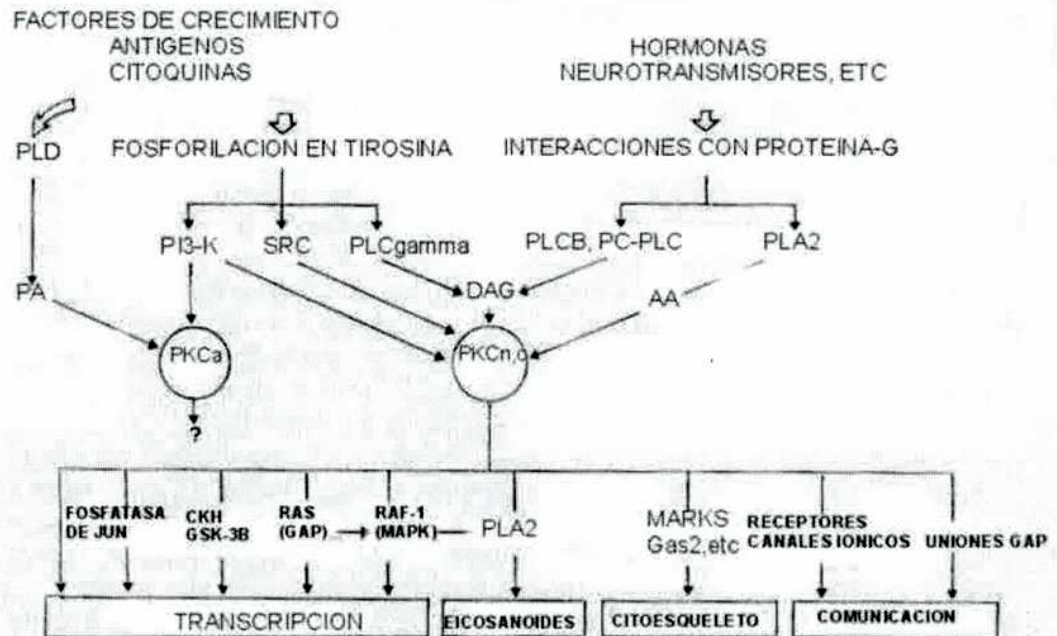
Dependiendo del mecanismo de activación enzimática, el cual es reflejado por parámetros estructurales específicos, la familia de PKC está clasificada en tres subfamilias:

- 1) PKC convencional (PKCc)**, su activación requiere calcio y diacilglicerol (DAG), subtipos α , βI , βII y γ ;
- 2) PKC nueva (PKCn)**, su activación requiere sólo DAG, subtipos ϵ , δ , η , θ y μ ;
- 3) PKC atípica (PKCa)**, su activación es independiente de calcio y DAG, subtipos ξ , λ y ι .

Debemos aclarar que esta clasificación refleja sólo la historia de investigación de estas proteínas, pero no el rol fisiológico que cumplen. Una característica común a las tres subfamilias, es que su actividad depende de fosfolípidos acídicos, tales como fosfatidilserina; además las PKC del tipo c requieren un ambiente de membrana para estar activas. Esto no significa que esté irreversiblemente integrada a estructuras de membrana, ya que todos los isotipos son encontrados también en citoplasma. Luego de su activación, las PKCs se encuentran reversiblemente unidas a estructuras celulares. Se observó que sólo clivando el dominio catalítico del regulatorio (al menos PKCc y n) gana independencia de los fosfolípidos, y puede funcionar como una quinasa activa constitutiva en el citoplasma y quizás en otros compartimentos celulares.

En la **Figura 17**, se esquematiza la relación entre los subfamilias de PKC y la transducción de señales de factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores.

Figura 17.



Proteína quinasa C como un paso versátil en la transducción de señales intracelulares.

La liberación de agentes activadores de PKC, tales como DAG y ácido araquidónico (AA), tanto como otros caminos activantes son estimulados por una amplia variedad de señales extracelulares, que actúan vía tres mecanismos principales de señales transmembrana: activación de fosfolipasa D (PLD), fosforilación en tirosina e interacciones receptor-proteína G. Después de la activación, la PKC cataliza la fosforilación de una serie de proteínas sustrato y así influencia procesos celulares fundamentales tales como la transcripción de genes, la dinámica del citoesqueleto, formación de mediadores (eicosanoides) y otros mecanismos de comunicación intracelular. Note que las proteínas sustratos de la PKCa son desconocidas. AA, ácido araquidónico; CKII, caseína quinasa II; DAG, diacilglicerol; GSK, glucógeno sintetasa quinasa; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; PA, ácido fosfatídico; PI3-K, fosfatidilinositol- 3- quinasa; PL, fosfolipasa.

Las PKCs tienen una forma de regulación intraestérica, mediante un pseudosustrato. En el estado inactivo, la molécula está plegada de tal forma

que el motivo de pseudosustrato en el amino terminal cubre el sitio de unión al sustrato, en la parte carboxi-terminal de la molécula. La unión del DAG o ésteres de forbol, produce un cambio conformacional, por clivaje proteolítico y probablemente por inserción a la membrana y fosforilación (Orr y col., 1992).

El DAG es un segundo mensajero, generado a partir de dos principales caminos de transducción de señales intracelulares: el catalizado por la PLC, que convierte a diferentes fosfolípidos de membrana, (por ejemplo, la PLC γ , a partir de fosfoinositol bifosfato produce inositol trifosfato y DAG); y el catalizado por hidrolasa fosfatídica, de hidrólisis de ácido fosfatídico que a su vez es liberado desde fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa D (PLD) (Boarder, 1994). La activación de PLC específica de fosfatidilcolina, que conduce a la liberación de DAG y la activación de PKC (Exton, 1994).

Proteína quinasa C y enfermedad.

Los fuertes efectos de activadores tales como los ésteres de forbol sobre la proliferación celular, la diferenciación y en particular la tumorigénesis experimental, lleva a la hipótesis de que las enzimas de la familia PKC podrían jugar importantes roles en enfermedades hiperproliferativas, en particular el cáncer. De esta manera, la expresión patológica de diferentes isoenzimas de PKC, su potencial oncogénico y antioncogénico tanto como su participación en promoción tumoral está sujeto a una intensa investigación (Hubbard y Cohen, 1993). Hasta el presente, ninguna de las isoenzimas de PKC ha sido identificada como producto de un proto-oncogen. Así, usando líneas celulares las cuales sobreexpresan isotipos de PKC individuales, varios autores fueron capaces de correlacionar activación de PKC específica de isoenzima con cambios en el crecimiento de células normales y neoplásicas y diferenciación (Goodnight, y col., 1994; Clemens y col., 1992).

La importancia del camino de quinasas de tirosina en el metabolismo de lípidos de membrana.

Existe bastante información con respecto al rol que juegan las quinasas de tirosina sobre los fosfoinosítidos. Margolis y col., (1989), encontraron que la

actividad de PTKs es indispensable para el recambio de fosfatidilinositol (PI) generado por REGF y RPDGF, ambos fosforilan en tirosina a la PLC - γ que transforma al PIP2 en IP3 y DAG (Johnson y Garrison, 1987). Evidencias recientes muestran que muchos ligandos incluyendo EGF y PDGF también pueden estimular la producción de DAG a partir de la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) mas que desde el PI (Exton, 1990). El DAG derivado de la hidrólisis de PC podría inducir diferentes efectos celulares que el proveniente de la ruptura de PIP2. Exton, (1990) propone que la ruptura de PC está involucrada en mecanismos de control celular que requieren la activación prolongada de PKC, por ejemplo: regulación de la transcripción y otros eventos relacionados al crecimiento celular y la diferenciación, control de la actividad de canales iónicos y alteraciones en funciones de receptores involucradas en la desensibilización y otras adaptaciones de células a ciertos estímulos durante tiempos prolongados.

Por otro lado, parece existir una conexión entre los esfingolípidos y la vía de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento. La observación de que el PDGF induce un incremento rápido y transitorio en los niveles de esfingosina intracelular y en la esfingosina 1- fosfato, tanto como sobre la actividad de esfingosina quinasa en fibroblastos, sugiere que los metabolitos de esfingolípidos pueden ser importantes mediadores de la acción mitogénica de éste y de otros factores de crecimiento (Olivera y Spiegel, 1993). También mostraron que AP-1 puede servir como un punto de convergencia donde se encuentren las señales derivadas de segundos mensajeros provenientes de esfingolípidos así como las señales procedentes de glicerofosfolípidos como el diacilglicerol.

TOXICOS TIPO DIOXINA Y EGF.

Matsumura y col.,(1984) reportaron que la TCDD administrada a ratas *in vivo* producía un espectacular aumento en proteínas quinasas dependientes e independientes de AMPc, en membrana plasmática de hígado. Esta activación de las quinasas estaba acompañada por una "down regulation" (regulación negativa) de un número de enzimas y receptores unidos a la

membrana plasmática, fundamentalmente del REGF (Moriya y col., 1986; Kärenlampi y col., 1983; Hudson y col., 1986). Luego, subsecuentes resultados experimentales confirmaron que la TCDD produce una regulación negativa del REGF *in vivo* (Madhukar y col., 1988; Matsumura y col., 1985) e *in vitro* (Moriya y col., 1986; Hudson y col., 1986) en una variedad de tejidos y tipos celulares, y que éste fenómeno está claramente mediado por el receptor Ah.

Proteínas quinasas marcadoras de exposición a dioxinas.

Se observó que luego de la exposición a la TCDD, ocurren una activación inicial de la PTK intrínseca del REGF, seguido de una modulación negativa por PKC vía fosforilación del residuo de treonina localizado cerca de la región transmembrana (Sibley y col., 1987). Se encontró que la proteína SRC responde rápidamente a la TCDD administrada *in vivo*, así como *in vitro*. Otros investigadores encontraron que el tóxico causa un aumento en el título de RAS, así como un incremento de las actividades de unión al GTP, (Jankun y col., 1989; Tullis y col., 1992).

Se encontraron también evidencias de que el mensaje de la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, desencadenado por la TCDD, es transmitido a factores transcripcionales nucleares (Ma y Babish, 1993), demostrando que aumenta la fosforilación en tirosina de la cdc2 kinasa hepática, proponiendo así que la fosforilación en tirosina es un marcador bioquímico sensible de exposición de los animales a las dioxinas (Ma y col., 1992). Es notable que la activación de la PTK de c-src está íntimamente asociada con la activación de cdc2 y la mitosis (Taylor y Shalloway, 1993).

¿Entonces, qué significado toxicológico tiene el camino de fosforilación de proteínas?

Parecería que la fosforilación de proteínas es clave para la expresión tóxica de los compuestos tipo dioxina, en diferentes especies animales y en diferentes líneas celulares. Bombick y Matsumura (1987b) observaron que tratando una cepa de ratones sensibles a la TCDD con quercetina (un inhibidor de proteínas quinasas) *in vivo*, evitaban la involución tímica producida por el tóxico, que se

sabe está mediada por el Ahr. Por otro lado, Puga y col. (1992) y Carrier y col., (1992), mostraron que inhibidores de la PKC como staurosporina y 2-aminopurina suspendían la inducción de la TCDD sobre el ARNm de CYP1A1. Ellos concluyeron que la PKC es necesaria para la formación del complejo Ah para la activación transcripcional del ARNm del CYP1A1, y que el sitio de fosforilación está sobre el receptor Ah.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA COMO MARCADORES DE TOXICIDAD.

Varios investigadores usan la medida de la actividad de enzimas de membrana plasmática, como marcadores de citotoxicidad de xenobióticos. Peterson y col., (1979) y Matsumura (1983) encontraron una fuerte disminución en la actividad de ATPasas (Na^+/K^+ y Mg^{++} dependientes) de membrana hepática en muestras de ratas tratadas con TCDD.

ATPasa Na^+/K^+ dependiente.

La **ATPasa Na^+/K^+ dependiente**, también llamada bomba de Na^+/K^+ , cataliza el pasaje de 2 K^+ al interior celular, y la salida de 3 Na^+ hacia el exterior, mediante la hidrólisis de una molécula de ATP para dar $\text{ADP} + \text{Pi}$. De esta manera, la bomba es la responsable directa de una pequeña transferencia neta de cargas positivas hacia afuera de la célula, contribuyendo así al potencial interno negativo (Eckert, 1990). La energía almacenada en la forma de un gradiente de concentración de Na^+ intracelular-extracelular se utiliza para impulsar el movimiento en contra de gradiente de otras sustancias como iones calcio, aminoácidos y azúcares, mediante difusión por intercambio y transporte acoplado. Por lo tanto, los tóxicos que disminuyan la actividad de esta enzima, estarán afectando también los transportes de varias moléculas de nutrientes, así como hormonas, etc. que necesitan del equilibrio osmótico/eléctrico.

5'Nucleotidasa.

Por otro lado, la **5'Nucleotidasa**, es una glicoproteína de membrana, que cataliza la degradación de Adenosina 5' monofosfato (5'AMP) a adenosina.



Merisko y col. (1981) encontraron que los fosfolípidos de membrana modifican la actividad de la enzima; la esfingomielina actuando sobre la estabilidad de la enzima, mientras que la fosfatidilcolina, afectando la energía de activación. Por otro lado, Whetton y Houslay (1983) observaron que la remoción de colesterol de las membranas condujo a un marcado incremento de la actividad de la enzima. La importancia de la 5'Nucleotidasa radica en que degrada nucleótidos, y los nucleótidos extracelulares y sus productos de degradación, particularmente adenosina, tienen múltiples efectos sobre funciones celulares, actuando sobre receptores purinérgicos (Che y col., 1997). El AMP puede seguir una vía alternativa de desaminación cuando aumenta su concentración, interviniendo secuencialmente las enzimas 5'Nucleotidasa y adenosina deaminasa. Además, la adenosina inhibe la lipólisis y aumenta la sensibilidad del tejido adiposo a la acción de la insulina (Green. y Newsholme, 1979).

ORNITINA DECARBOXILASA Y POLIAMINAS.

Las poliaminas **putrescina (pt)**, **espermidina (spd)** y **espermina (spn)** se encuentran en todas las células procarióticas y eucarióticas (**Figura 18**). Si bien no se conoce el modo de acción definitivo de las mismas, se sabe que están involucradas en muchas funciones celulares, como: mantenimiento de las membranas celulares, homeostasis del Ca^{2+} , transporte de metabolitos y iones (Schuber, 1989), proliferación celular (J ä nne y col., 1991), migración celular (McCormack y col., 1993; Zim merman y col., 1995), actividad transglutaminasa (McCormack y col., 1994), transducción de señales (Blachowski y col., 1994), transcripción de genes relacionados al crecimiento (Celano y col., 1989), producción hormonal (Sjoholm, 1993) y otros procesos fisiológicos vitales. In vivo, las poliaminas son esenciales para la cicatrización

de lesiones gastrointestinales causadas por una variedad de injurias (Banan y col., 1996). Se encontraron en altos niveles en cáncer, donde la proliferación celular a menudo está descontrolada (Jänne y col., 1991). Las poliaminas, al ser policationes, y tener tres o cuatro cargas positivas netas distribuidas a lo largo de su molécula, pueden interactuar de forma más flexible con polianiones como el ADN, el ARN y los fosfolípidos (Marton y Morris, 1987).

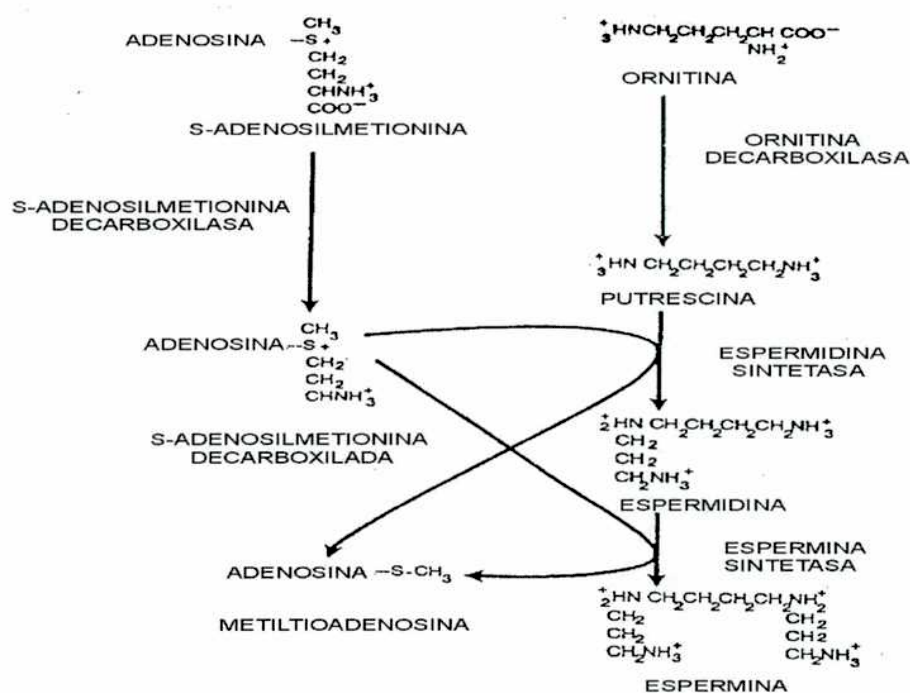
El control regulatorio de la biosíntesis de poliaminas en mamíferos y hongos, está ejercido principalmente por dos enzimas: **ornitina decarboxilasa (ODC)** y **S-Adenosilmetionina decarboxilasa (SAMDC)** (Tiburcio y col., 1997). La ODC cataliza la remoción de un grupo carboxilo desde la ornitina, para dar putrescina. La SAMDC, introduce S-adenosilmetionina (SAM) dentro de este camino biosintético para ser usado en su forma decarboxilada como un donante de aminopropilos, en la conversión de putrescina a espermidina y de espermidina a espermina (**Figura 18**), catalizada por la **Espermidina sintetasa** y la **Espermina sintetasa**, respectivamente. En los tejidos en reposo de roedores, se observó que la actividad de espermidina sintetasa era mayor que la de espermina sintetasa (Williams - Ashman y Pegg, 1981).

En mamíferos, también existe una serie de reacciones, las cuales por acetilación y oxidación convierten la espermina en espermidina y la espermidina en putrescina (Pegg, 1986; Davis y col., 1992) (**Figura 19**). El camino de acetilpoliaminas le permite a las células ajustar el exceso de espermidina y espermina, ambas prominentes en mamíferos (Tiburcio y col., 1997).

La actividad de la ODC puede ser específica e irreversiblemente inhibida por la **α -difluoro-metilornitina (DFMO)**, un análogo de la ornitina. El mecanismo de acción del DFMO, es que funciona como inhibidor suicida que no interfiere con otras reacciones enzimáticas en las cuales la ornitina actúa como sustrato (Jänne y col., 1991). El efecto de este inhibidor sobre el nivel de poliaminas celulares, es disminuir el contenido de putrescina y espermidina hasta valores

indetectables, pero afecta muy poco los niveles de espermina (Pegg y McCann, 1982).

Figura 18



Estructura de poliaminas y camino biosintético.

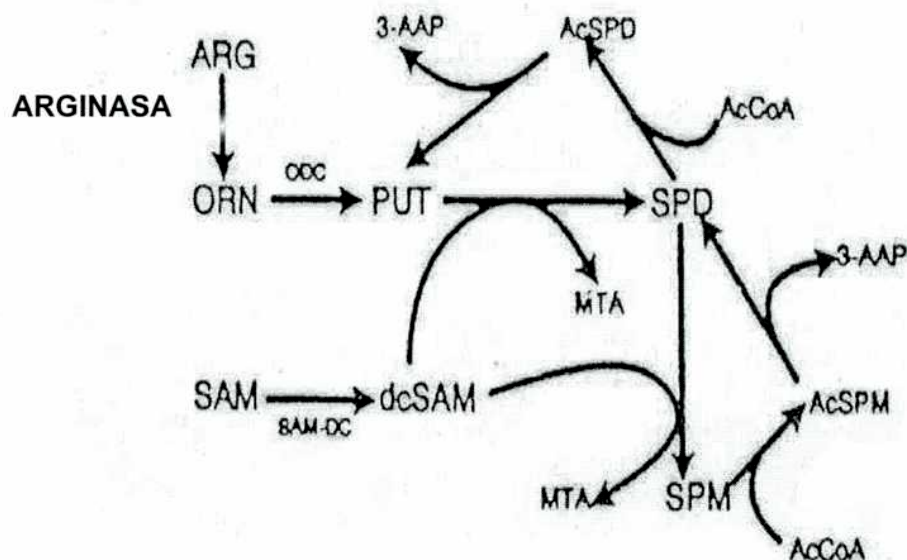
Con respecto a la regulación de la ODC, es conocido que las poliaminas ejercen un fuerte control tanto sobre la síntesis como la degradación de la enzima (Heby y Person, 1990; Persson y col., 1996). El recambio de ODC es extremadamente rápido, con una vida media biológica de menos de 1 hora. Se encontró que este recambio está influenciado por poliaminas (Hayashi y Murakami, 1995) y depende de la síntesis de una proteína llamada antienzima,

que se induce por exposición a un exceso de poliaminas y se une con alta afinidad a la ODC, provocando cambios conformacionales en la enzima que la exponen al proceso degradativo (Hayashi y col., 1996; Li y Coffino 1992, 1993).

La regulación de la actividad de la SAMDC , está ejercida negativamente por las poliaminas spd y spn, pero no por put. Cuando spd y spn están presentes en exceso, la SAMDC es regulada rápidamente en forma negativa; e inversamente, en situaciones en las que los niveles celulares de spd y spn están reducidos (Heby y Persson, 1990; Persson y col., 1996).

En células normales, la actividad de ODC es estimulada rápida y transitoriamente por factores de crecimiento (Pegg, 1986, 1988), mientras que en células transformadas por carcinógenos químicos (Gilmour y col., 1986) y oncogenes como v-src (Höltkä y col., 1993), neu (Sistonen y col, 1989a) y ras (Höltkä y col, 1988; Sistonen y col, 1989a, 1989b) la actividad de ODC está constitutivamente elevada, con pérdida de las fluctuaciones relativas al ciclo celular. El incremento en la actividad de ODC parece representar un paso crucial en el proceso de transformación, por ejemplo la transformación celular de fibroblastos de rata inducida por v-src se puede bloquear por un ARN antisentido para la síntesis de ODC, o por un inhibidor específico de la misma (Höltkä y col., 1993). Se ha propuesto que la ODC actúa en un punto convergente del camino de transducción de señales de muchos oncogenes, porque la mera sobreexpresión de la ODC conduce a la transformación celular.

Figura 19.



Camino biosintético de poliaminas en mamíferos. El camino de acetilpoliaminas permite a las células ajustar el nivel de poliaminas y disponer del exceso de espermidina y espermina. En mamíferos, la arginasa participa en la biosíntesis de poliaminas por la disponibilidad de ornitina desde la arginina dietaria. ARG, arginina; 3-AAP, 3-acetamidopropanal; AcCoA, acetil coenzima A; AcSPD, acetilspermidina; AcSPM, acetilespermina; MTA, metiltioadenosina; ORN, ornitina; SAM-DC, SAM decarboxilasa.

Poliaminas y EGFR.

Las poliaminas están involucradas en muchas acciones del Factor de Crecimiento Epidérmico. Se encontró que el DFMO podía prevenir la inhibición de la secreción ácida de las células parietales estimuladas por el EGF (Wojciechowski, y col., 1995). Las poliaminas inhiben la actividad de quinasa de tirosina del EGFR en las células A-431 (Faaland y col., 1995). En una línea celular de cáncer de colon, Caco2, la entrada de poliaminas es estimulada por EGF e inhibida por genisteína, un inhibidor de las quinasas de tirosina (Milovic y col., 1995). En células L6 y mioblastos bovinos fetales, el EGF y

el TGF- α , también ligando del EGFR, estimulan la biosíntesis de poliaminas, sugiriendo que éstas son importantes en los eventos tempranos inducidos por EGF (Blachowski y col, 1994). Además, las poliaminas funcionan como estimuladores naturales de las fosfatasa de serina/treonina (Tung y col., 1985), modulando así la acción de algunas hormonas y factores de crecimiento (Shenolikar y Nairn, 1991).

OTROS EFECTOS DEL HEXACLOROBENCENO.

a) El Hexaclorobenceno afecta la expresión del gen de la enzima málica.

En trabajos recientes de nuestro laboratorio, encontramos que en ratas tratadas durante 9 y 15 días con HCB (100 mg/100 g p.c.), los niveles de ARNm de la enzima málica (EM) hepática aumentaban significativamente, no estando afectados los niveles de otras enzimas hormonotiroideo-dependientes de otros caminos metabólicos, como la gliceraldehído 3 -P deshidrogenasa (GAPDH, glucólisis) y la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, gluconeogénesis). Este efecto del HCB sobre la expresión del gen de la EM, no estaba mediado por un aumento en el número de receptores de T₃ ni por una mayor unión de la T₃ a su receptor nuclear. Observamos también que el nivel de ARNm del RT₃ (α_1 y β_1) no estaba afectado por la administración con HCB (Loaiza y col., 1998). En experimentos realizados con células H35 transfectadas con promotor completo de la EM, y con diferentes mutaciones y deleciones del mismo, se demostró que el elemento de respuesta de hormonas tiroideas (TRE), estaba involucrado en la acción del HCB. Asimismo, en experimentos de retardo en gel, usando extractos nucleares de hígado de ratas controles y tratadas, observamos que el tóxico aumentaba la formación de los complejos ADN/proteína usando un oligonucleótido correspondiente al elemento TRE del promotor de la EM. Resultados similares se obtuvieron con células de hepatoma H35 tratadas *in vitro* con HCB (Loaiza Pérez y col., 1999).

b) El Hexaclorobenceno altera la lipogénesis en tejido adiposo marrón.

Estudios recientes de nuestro laboratorio, indicaron que la administración de HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 30 días, redujo significativamente las actividades de las enzimas lipogénicas generadoras de NADPH, enzima málica (EM) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y de la enzima L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (LG3PD) en tejido adiposo marrón (TAM). Estos resultados se obtuvieron tanto en ratas eutiroideas como en ratas tiroidectomizadas, mostrando que el efecto no depende de la presencia de hormonas tiroideas, ni de la inervación simpática del TAM (Alvarez y col., 1999a). El efecto estimulador de dosis saturantes de T₃ sobre las actividades de la EM y la LG3PD fue reducido por HCB. Estos resultados muestran que el TAM es un tejido blanco en la toxicidad inducida por HCB, lo cual involucra severas alteraciones en la regulación de la lipogénesis.

c) Hexaclorobenceno y función reproductiva en hembras.

En nuestro laboratorio, recientemente, investigamos las alteraciones producidas por la administración oral de HCB (100 mg/100 g p.c.) a ratas hembras, durante 30 días, sobre parámetros de la función reproductiva. Se encontraron: ciclos estrales alterados, disminución en la cantidad de óvulos liberados, disminución de las concentraciones séricas de estradiol y del número de receptores uterinos nucleares, aumento de los niveles séricos de FSH y una pronunciada disminución en los niveles de prolactina, sin alteraciones en los niveles de LH y progesterona. Los estudios histológicos mostraron: un aumento en el número de folículos atrésicos, oocitos con núcleo picnótico, infiltrado inflamatorio de células de la granulosa y de la teca, así como hiperplasia e hipertrofia del epitelio germinal (Alvarez y col., 1999b). Estos hallazgos indicaron que el HCB es un tóxico reproductivo, alterando tanto funciones ováricas como la regulación hipotálamo-hipofisiaria.

RELEVANCIA DEL TRABAJO.

Este trabajo se encuentra enmarcado dentro de los objetivos de la OMS, PNUMA, con respecto al empleo de plaguicidas y sus efectos sobre la salud de la población, lo que pone de relevancia en cuanto al propósito de contribuir al mejoramiento de la salud humana.

La Organización Mundial de la Salud y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (1992), recomiendan : a- obtención de plaguicidas menos peligrosos que no se absorban fácilmente a través de la piel o por inhalación, b- realizar estudios a largo plazo en el animal, c- formular normas para evaluar y extrapolar los datos obtenidos en los animales, d- intensificar los estudios *in vitro* para aclarar el mecanismo de acción de los diferentes plaguicidas, e- aumentar los estudios metabólicos, a fin de identificar metabolitos que puedan utilizarse para la detección de trabajadores expuestos, f- vigilar regularmente las concentraciones que alcanzan los residuos de plaguicidas en el aire, el suelo y el agua, g - vigilar los residuos de plaguicidas en los alimentos, constituyendo uno de los métodos más importantes para reducir los peligros consiguientes para la salud humana, h - aumentar y reorientar las encuestas epidemiológicas, i -encontrar marcadores biológicos que permitan descubrir las modificaciones iniciales y puedan ponerse a prueba en las poblaciones expuestas.

Otro rasgo relevante de este trabajo, es que se trata de los primeros estudios sobre el efecto del HCB sobre transducción de señales, y en el que se emplean dosis 100 y 1000 veces menores y exposiciones a tiempos más cortos que las que normalmente producen efectos tóxicos. Es importante señalar, que los niveles de exposición de las poblaciones humanas a los químicos ambientales son usualmente varios órdenes de magnitud menores que las concentraciones usadas en la mayoría de los trabajos experimentales realizados hasta el presente en animales de laboratorio. Es por ello, que las extrapolaciones de los resultados experimentales obtenidos con esas altas dosis, no reflejarían, al menos en parte, los efectos que las concentraciones muy inferiores encontradas en el medio ambiente, pueden producir en los sistemas biológicos.

OBJETIVOS.

- Nuestro principal objetivo fue el estudio del mecanismo de acción del HCB sobre transducción de señales en hígado de rata, fundamentalmente del camino de receptores de factores de crecimiento.

Para ello, se estudiaron los siguientes parámetros:

- funciones enzimáticas de la membrana celular hepática
 - fosforilación de proteínas endógenas, de membrana y citosólicas
 - niveles de receptor de EGF,
 - actividad de quinasas de tirosina, de membrana y citosólicas.
 - contenido de fosfotirosina de proteínas endógenas, de membrana y citosólicas
-
- Se estudió luego, su relación con efectos adversos y/o tóxicos del pesticida, tales como la hipotiroxinemia y la porfiria. Por otro lado, en el marco de un tratamiento crónico, estábamos interesados en el estudio del mecanismo de acción a dosis muy bajas, donde no estarían involucradas las patologías antes mencionadas.
-
- Como último objetivo, investigamos si el HCB modificaba la actividad de Ornitina Decarboxilasa y el contenido de poliaminas, así como su relación con las actividades de quinasas de tirosina y proteína quinasa C.

MATERIALES Y METODOS

Productos Utilizados. El hexaclorobenceno (HCB, > 99 % de pureza, grado comercial) fue obtenido de Máximo Paz S.A. (Buenos Aires, Argentina). El [³²P]ATP (6000 Ci/mmol) y la [L-1-¹⁴C]-ornitina fueron comprados en NEN (Boston, M.A.). El anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) humano, y las membranas de nitrocelulosa fueron comprados en Calbiochem (La Jolla), y el anticuerpo policlonal contra fosfotirosina, hecho en rata, en Transduction Laboratories (Lexington, KY). Se utilizaron compuestos químicos de grado ACS de Sigma Chemical Co. (St. Louis, M.O.).

Animales y diseño experimental. Las ratas Wistar hembras (160-180 g al comienzo del experimento) se adquirieron en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Fueron alimentadas con alimento balanceado Purina 3, (Cabeca, S.C.A., Argentina) y agua ad libitum. Las condiciones ambientales del bioterio consistieron en ciclos de 12 h luz - 12 h oscuridad, 22-24 ± 3 °C de temperatura y 45-75 % de humedad. Luego de un período de aclimatación de 7 días, 5 ml de suspensiones acuosas de HCB a distintas concentraciones, en Tween 20 (0.5 ml/100 ml) fueron administradas diariamente por intubación gástrica. Los animales control recibieron iguales volúmenes de solvente apropiado por la misma vía. La dosis máxima de HCB empleada en todos los ensayos fue de 100 mg/100 g p.c., elegida en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Kleiman de Pisarev, y col., 1989; 1990) que demostraron que dicha dosis desencadenaba claras manifestaciones de porfiria hepática y alteraciones del metabolismo de las hormonas tiroideas.

Para los ensayos de inhibición de la actividad de Ornitina Decarboxilasa (ODC) *in vivo*, se utilizó difluoro metilornitina (DFMO), un inhibidor irreversible suicida específico, análogo de la ornitina. Este producto soluble, fue suministrado a las ratas, en el agua de bebida en una concentración al 2%, desde 24 horas antes de comenzar el tratamiento con HCB (100 mg/100 g p.c.).

La salud general de los animales, evaluada por el comportamiento y apariencia de las ratas, examen de la epidermis, membranas mucosas, peso

corporal y consumo de alimento y agua, no fue afectada por la dosis de HCB empleada.

Preparación de fracciones subcelulares.

Microsomas y citosol . Luego de 10-12 horas de ayuno, los animales fueron sacrificados por decapitación y los hígados perfundidos con NaCl 0.154 M y usados inmediatamente para la preparación de membranas plasmáticas, microsomas y citosol.

Se aislaron microsomas a partir de un homogenato crudo de hígado en Hepes-Tris 25 mM (pH 7.4) suplementado con sacarosa 250 mM, conteniendo inhibidores de proteasas: bacitracina 10 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, pepstatina A 10 µg/ml, quimostatina 10 µg/ml y PMSF(para metil sulfonil fluoruro) 2 µM. El homogenato crudo se centrifugó durante 20 minutos a 12.000 xg para separar las células rotas, la fracción nuclear y las mitocondrias. El sobrenadante obtenido fue centrifugado durante 60 minutos a 100.000 xg para obtener la fracción microsomal y citosólica. En los inmunoensayos para determinar fosfotirosina, los homogenatos se prepararon en presencia de inhibidores de fosfatasa, ortovanadato de sodio 2 mM (Na_3VO_4) y fluoruro de sodio 100 mM (NaF), con el propósito de impedir la acción de las fosfatasa sobre los residuos de tirosina que ya habían sido fosforilados durante el tratamiento *in vivo* con HCB. El vanadato es un potente inhibidor de fosfatasa de tirosina y ejerce así indirectamente, una activación de algunas quinasas de tirosina (Ueki y col., 1995). Sin embargo, en algunos casos el vanadato puede estimular la actividad de quinasas de tirosina directamente (Earp y col., 1983). El NaF es un inhibidor de las fosfatasa de serina/treonina (Brautigan y Shriner, 1991).

Membranas plasmáticas. Las membranas plasmáticas fueron aisladas a partir de 6-8 g de hígado fresco, perfundido con solución fisiológica, por centrifugación diferencial seguido por una técnica de purificación en gradiente de sacarosa (Hubbard y col., 1983). Esencialmente, los hígados fueron homogeneizados en STM 0.25 M (sacarosa 0.25 M, Tris- HCl 5 mM, pH 7.2-7.6, MgCl_2 1 mM) con 10 golpes en un homogeinizador de vidrio tipo Dounce con émbolo de vidrio. El homogenato fue ajustado al 20 % (peso de hígado / volumen total) con STM 0.25 M y luego filtrado por cuatro capas de gasa. El

filtrado se centrifugó a 280 xg durante 5 minutos y se descartó el precipitado. El sobrenadante, se centrifugó a 1.500 xg durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió con tres golpes de Dounce en 1,2 volúmenes de STM 0.25 M / gramo de hígado inicial. Seguidamente, se agregó STM 2.0 M hasta obtener una densidad final de 1,18 g/ml. Finalmente, se agregó suficiente STM 1.42 M ($\delta = 1,18$ g/ml) para llegar a un volumen igual al doble del homogenato inicial. Alícuotas de 35 ml fueron colocadas en tubos de centrifuga plásticos y por encima, se adicionaron de 2 a 4 ml de sacarosa 0.25 M. Luego se centrifugó durante 60 minutos a 82.000 xg (sin freno) y el precipitado obtenido en la interfase fue recogido cuidadosamente con pipeta Pasteur y resuspendido en sacarosa 0.25 M para obtener una densidad final de 1,05 g/ml. Esta suspensión fue centrifugada a 1.500 xg durante 10 minutos y el precipitado final fue resuspendido en sacarosa 0.25 M y guardado a -20 °C.

Determinación de la actividad de ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente. Las membranas microsomales se resuspendieron en Tris-HCl 138 mM (pH 7.4), EDTA 1mM y guardaron a -70 °C hasta la medición de la actividad de ATPasa de acuerdo al método de Richards y col., (1978). A 100 μ l de la muestra resuspendida, se le agregaron 400 μ l de mezcla de reacción que contenía NaCl 120 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), EGTA 1 mM, ATP 2 mM y 0,1 μ Ci/ tubo de [γ -³²P-ATP]. Se usó como blanco de ensayo a las preparaciones que contenían ouabaína, en ausencia de NaCl 120 mM. La ouabaína es un bloqueante específico de la ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente. Los tubos se incubaron durante 60 minutos a 37 °C con agitación continua. La reacción se detuvo en hielo con 750 μ l de molibdato de amonio 0,5 % en ácido perclórico 10 %, seguido por el agregado de 600 μ l de alcohol isobutílico. Seguidamente se incubó durante 15 segundos a 37 °C agitando luego en vortex para mezclar las dos fases y lograr que el fosfato pase a la fase alcohólica. Se centrifugó luego a 2000 rpm durante 2 minutos. De la fase superior de cada tubo, se tomó una alícuota de 300 μ l y se midió la radioactividad en contador beta de centelleo líquido. La actividad enzimática fue lineal con respecto al tiempo y a la cantidad de proteína. La actividad se expresó como pmol de Pi/ mg de proteína por minuto.

Determinación de la actividad de 5'Nucleotidasa. La actividad de 5'Nucleotidasa se determinó de acuerdo al método de Widnell y Unkeless (1968). Los microsomas hepáticos aislados se mantuvieron en freezer a -20°C durante 3 a 6 días. Las muestras se resuspendieron en sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM (pH 7.4) en Potter Elvehjem con pistón de teflón. Se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) y se llevó a una concentración final de 5 mg/ml. La actividad enzimática fue medida por incubación en un volumen final de 0.5 ml a 37°C durante 20 minutos, conteniendo: 50 μl de proteína y 450 μl de una mezcla de Na-5'AMP 50 mM, glicina-NaOH 0.5 M (pH 9.1), MgCl_2 0.1 M y agua, en relación 1:2:1:5. La reacción se detuvo por el agregado de 25 μl de ácido tricloroacético (TCA) 50 %. Después de mantener los tubos durante 30 minutos en frío, se centrifugaron durante 10 minutos a 750 xg. El blanco se realizó con 50 μl de agua destilada. El sobrenadante se utilizó para la determinación de fosfato inorgánico (Reacción de Ames), donde se tomaron 50 μl del sobrenadante (o K_2HPO_4 1 mM de estándar) y se llevó a 250 μl con agua bidestilada. Se agregaron 700 μl de una mezcla de ácido ascórbico 10 % en agua destilada (preparado fresco) y molibdato de amonio 0.42 % en ácido sulfúrico 1 N, en relación 1:6. Seguidamente se incubaron durante 20 minutos en baño calefactor a 45°C . Se leyó la absorbancia a 660 nm. Para la curva de calibración, se fabricó una solución estándar de K_2HPO_4 1 mM, usándose 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 μl de solución estándar por cada tubo.

Determinación de fosfolípidos endógenos. Las proteínas microsomales hepáticas se cuantificaron por el método de Lowry y col., (1951), previa digestión alcalina. Los lípidos se extrajeron con cloroformo: metanol: (1:1 vol/vol) según el método de Bligh E.G. y Dyer N.J. (1959). Luego los fosfolípidos se separaron por cromatografía en capa delgada en un sistema de una dimensión con dos solventes. El primer sistema de solventes usado fue una mezcla de cloroformo: metanol: ácido acético: agua (40: 10: 10: 1 v/v). Las placas se secaron y desarrollaron hasta un nivel de 0.6 cm por debajo del frente del primer solvente, en un segundo sistema de solventes que consistía en cloroformo: metanol: ácido acético: agua (120: 46: 19: 3, v/v) . Los valores de R_f para este sistema fueron: 0.20, 0.30, 0.47, 0.55 y 0.70 para esfingomielina

(SPH), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE), respectivamente. Los ácidos grasos libres migraron con el frente del solvente (Weiss y col., 1982). Las fracciones lipídicas fueron detectadas con vapor de I_2 . Para la cuantificación de los fosfolípidos, áreas específicas de las placas cromatográficas se rasparon y luego se digirieron con 70 % de ácido perclórico en presencia de molibdato de amonio (0.5 %). El fosfato inorgánico resultante se determinó con el reactivo de Fiske -Subarrow (Barlett, 1959).

Fosforilación *in vitro*. Las proteínas citosólicas y de membrana frescas, recientemente aisladas, fueron fosforiladas por el método de Rubin y col., (1982) con modificaciones. La reacción de fosforilación se realizó a 30 °C en un volumen total de 100 μ l, conteniendo 100 μ g de proteína resuspendida en Pipes 50 mM (pH 7.0), $MgCl_2$ 30 mM, 2- mercaptoetanol 10 mM, y EGTA 0.32 mM en presencia o ausencia de inhibidor de fosfatasas Na_3VO_4 200 μ M y/o NaF 50 mM. Se preincubó la mezcla durante 15 minutos a 0 °C y la reacción se inició por el agregado de 20 μ Ci de [γ - ^{32}P -ATP] (2 μ M) por tubo. La reacción se detuvo luego de 10 minutos de incubación, usando 50 μ l de solución detenedora (dodecilsulfato de sodio 9 %/ 2-mercaptoetanol 6 %/ Tris 30 mM (pH 7.8)/ glicerol/azul de bromofenol). Los tubos se taparon y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Luego se guardaron a - 20 °C hasta su separación electroforética en geles de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas citosólicas y de membrana (25-50 μ l) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5- 10 %, de acuerdo al método de Laemmli (1970) en una cuba Mini-Protean II (Bio-Rad). Los geles de 0.75 mm de grosor se sembraron y se corrieron a un voltaje constante de 150 V durante 45- 60 minutos, a 4 °C. El buffer de corrida (5X) usado fue Tris 0.12 M, glicina 1 M y SDS 10 % (pH 8.3). Seguidamente, los geles se trataron con TCA al 10 % durante 1 hora, para fijar las proteínas y luego se tiñeron con Coomassie brilliant blue durante 1 hora a 65 °C con agitación. Posteriormente se lavaron con solución de ácido acético 10 %/ metanol 10 %, para blanquear el fondo y se secaron y expusieron en placas

de autoradiografía Kodak XAR-5, dentro de cassettes herméticos con placas amplificadoras, a - 20 °C. El tiempo de exposición varió entre 7 y 15 días. El peso molecular de las diferentes bandas de proteínas analizadas, fue determinado a partir de la comparación con proteínas estándar de peso molecular (no preteñidas), de 29 a 200 Kd (Sigma, St Louis M.O.).

Ensayo de unión del [¹²⁵I] EGF a sus receptores de membrana. Este ensayo fue realizado usando el Factor de Crecimiento Epidérmico murino (mEGF) iodinado, de acuerdo al método de Molinolo y col., (1987). La unión inespecífica fue realizada en presencia de 500 ng de mEGF. Las K_a y $B_{máx}$ se expresaron como nM^{-1} y fmoles de [¹²⁵I] EGF/mg de proteína, respectivamente.

Inmunoblot para el receptor de EGF. Fracciones de membrana plasmática y microsomal hepáticas ajustadas a la misma concentración de proteínas, fueron tratadas con buffer de siembra (Tris 0.125 M (pH 6.8), SDS 10 %, glicerol 20 % y azul de bromofenol 0.03 %) y calentadas durante 5 minutos. Se corrieron cantidades equivalentes de proteína de cada muestra (300-500 μg /calle) en geles de poliacrilamida - SDS 7.5 %. Luego, el gel y la nitrocelulosa se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %) durante 10 minutos. Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, usando un aparato de transferencia Miniprotean a 30 V, durante toda la noche, con agitación a 4 °C. Luego, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante 1 hora con TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) con seroalbúmina bovina (BSA) al 3 %. Seguidamente, se incubó con anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF (1:500) en TBSTB (TBS al 0.1 % de BSA y 0.1 % de Tween 20) durante 2 horas a 37 °C. Las membranas fueron lavadas cuatro veces con TBSTB. Los complejos antígeno -anticuerpo fueron detectados, incubando durante 1 hora con un segundo anticuerpo contra IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina, (1:1000) en TBSTB y luego se lavaron cuatro veces en el mismo buffer. Para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, se incubó la membrana en una mezcla conteniendo el sustrato colorimétrico de la fosfatasa alcalina, BCIP/NBT (Tris 100 mM, pH 9.5, 5- bromo-4-cloro-3-indol fosfato 150 μg /ml, azul de nitrotetrazolium 300 μg /ml, $MgCl_2$ 5 mM), obteniendo de esta manera, en unos minutos, el color azul característico.

Inmunoblot para fosfotirosina. Se obtuvieron fracciones microsomales y citosólicas a partir de homogenatos tratados con inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 1mM y NaF 50 mM). La determinación del contenido de fosfotirosina de las proteínas separadas, se realizó con el mismo protocolo usado para analizar los niveles del receptor de EGF. La nitrocelulosa se incubó con anticuerpo policlonal contra fosfotirosina, de conejo (1:1000) en TBSTB durante 2 horas a 37 °C . Luego se lavó la membrana y seguidamente se trató durante 1 hora con el segundo anticuerpo IgG contra conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000), usando BCIP/NBT como ensayo colorimétrico.

Ensayo de actividad de proteínas quinasas de tirosina. La actividad de quinasas de tirosina (PTKs) fue ensayada en fracciones de membrana plasmática, microsomal y citosólica, utilizando como sustrato exógeno el péptido sintético poli Glu-Tir [Glu^{80} Na, Tir^{20}] (poli-GT), como describen Tremblay y Beliveau (1994). Las proteínas se llevaron a una concentración de 16 mg/ml resuspendidas en sacarosa 50 mM, Hepes-Tris 5 mM (pH 7.4) y preincubadas durante 1 hora a 4 °C en presencia de Tritón X-100 al 0.05 % (v/v), conteniendo inhibidores de proteasas (bacitracina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pepstatina A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quimostatina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y PMSF 2 mM). La fosforilación del péptido sintético poli-GT, se llevó a cabo en una mezcla de reacción conteniendo 80 μg de proteínas, poli-GT 500 μg , 8 μCi de [γ - ^{32}P -ATP] (40 μM), MnCl_2 20 mM, Na_3VO_4 0.2mM y Hepes-Tris 25 mM (pH 7.0) en un volumen final de 100 μl , durante 30 minutos a 30 °C. La reacción de fosforilación se detuvo por el agregado de 100 μl de una solución conteniendo TCA 10 % (v/v), NaH_2PO_4 10 mM y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y luego se filtró a través de filtros Millipore (0.45 μm), lavándose tres veces con 5 ml de solución detenedora. La radioactividad asociada al filtro se midió en un contador de centelleo líquido para radiación beta. Se utilizó como blancos, a los ensayos donde se omitía el poli-GT. Los ensayos de fosforilación fueron lineales por encima de los 30 minutos.

Determinación de las actividades de Uridín Difosfato-Glucuroniltransferasas (UDPGTs) para T₄ y T₃

Los hígados se homogeneizaron en Tris 50 mM, KCl 150 mM (pH 7.4) a 4 °C y se centrifugaron a 900 xg durante 20 minutos. El sobrenadante se centrifugó durante 1 hora a 100.000 xg y el precipitado se lavó con KCl 150 mM, EDTA 10 mM (pH 7.4). Los microsomas (0.4 mg de proteína) fueron resuspendidos en sacarosa 0.25 M (1 ml/g de tejido) e incubados con T₄ (o T₃) 150 µM, 1.2 µCi, [¹²⁵I-T₄] o [¹²⁵I-T₃], ácido UDP-glucurónico (UDPGA) 40 mM, Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 10 mM, Brij 58 0.05 % (pH 7.8) en un volumen final de 200 µl, durante 60 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de igual volumen de metanol frío. Las proteínas fueron separadas por centrifugación y se sembraron 20 µl de cada sobrenadante sobre placas de sílica gel, para cromatografía en capa delgada Whatman LK6DF. Se utilizó como solvente de desarrollo: acetato de etilo: metil etil cetona: ácido fórmico: agua: ácido acético glacial (50: 30: 2.5: 10: 7.5), corriéndose durante 75-90 minutos. Cada carril de la placa fue cortado en fracciones de 0.5 cm y la sílica gel fue raspada para analizar la radioactividad en un contador Packard Autogamma 5650. Para el cálculo de la actividad glucuronidante para T₄ o T₃, se le restó a la radioactividad correspondiente a la mancha de glucurónido de T₄ (o glucurónido de T₃), la radioactividad de las muestras blanco (sin UDPGA).

Determinación de la actividad de uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD). Los homogenatos de hígado y las preparaciones enzimáticas se realizaron como describe Sopena y col., (1994). Los homogenatos se prepararon con KCl 0.154 M (1:5, P/V) y se centrifugaron a 12.000 xg durante 20 minutos. Los sobrenadantes se filtraron a través de una columna de Sephadex G-25 con buffer K₂HPO₄ 0.134 M, (pH 6.8). Los eluidos con o sin trazas de fluorescencia fueron agrupados y usados para la preparación enzimática. La mezcla de incubación para Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO -D) contenía buffer K₂HPO₄ 67 mM (pH 6.8), EDTA 0.1 mM, DTT 1.66 mM, uroporfirinógeno III (6 µM) como sustrato y la preparación enzimática, en un volumen final de 500 µl. Se incubó a 37 °C, durante varios períodos de tiempo, en oscuridad, bajo atmósfera de N₂ con agitación. La reacción fue detenida por el agregado de HCl concentrado (5 % P/V final) y dimetil sulfóxido (DMSO)

21 % (V/V final) y se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos. Las porfirinas formadas se analizaron por HPLC en una columna de 125 x 4 mm, Lichrospher 100 RP-18.5 μ m, Merck, usando un sistema de solventes de 15 minutos de gradiente lineal desde acetonitrilo 10 % hasta 30 % (V/V) en buffer de acetato de amonio (pH 5.2), seguido de una elución isocrática de acetonitrilo al 30 % por otros 10 minutos. La velocidad de flujo fue de 1 ml/minuto y el detector de fluorescencia fue programado para excitación y emisión en 404 y 618 nm de longitudes de onda respectivamente, como describen Lim y col., (1988).

Determinación de T₄ y T₃ séricas. Las concentraciones de tiroxina y triiodotironina séricas fueron determinadas por radioinmunoensayo (RIA), con técnica de doble anticuerpo - PEG (Diagnostic Products Corporation). Cada muestra fue ensayada por duplicado.

Actividad de ornitina decarboxilasa (ODC). El tejido hepático fresco se homogeneizó en buffer conteniendo KH₂PO₄ 50 mM (pH 7.5), EDTA 0.1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, fosfato de piridoxal 0.06 mM y PMSF 1mM. El homogenato se centrifugó a 3000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante (50 μ l) se agregó a la mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 100 mM (pH 7.5), DTT 2.5 mM, fosfato de piridoxal 0.1 mM, PMSF 1 mM, L -ornitina 1 mM y 0.2 μ Ci [L-1- ¹⁴C] ornitina, en un volumen total de 250 μ l. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 60 minutos. La reacción se detuvo agregando TCA al 30 %, y se mantuvo en las mismas condiciones durante 30 minutos, para estimular la liberación de ¹⁴CO₂. El ¹⁴CO₂ liberado se atrapó en un trozo de papel de filtro Whatman, previamente embebido en hiamina y luego se cuantificó en un contador de centelleo. La actividad de ODC, se midió como la liberación de ¹⁴CO₂ a partir de ornitina y se expresó como nmoles de CO₂ liberado por miligramo de proteína por hora. Con el objetivo de ensayar la estabilidad de la enzima ODC hepática, se determinó su actividad en dos condiciones: en hígado fresco recién ablacionado y en hígado previamente guardado a - 20 °C, durante 24 horas. El resultado fue de una buena actividad específica para el hígado fresco, por lo que todas las determinaciones se realizaron en esas condiciones. La actividad ensayada

en el órgano previamente freezeado fue muy baja comparada al hígado fresco.

Determinación de poliaminas libres. Para extraer las poliaminas hepáticas libres, se utilizó ácido perclórico 0.2 N a 4 °C. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 1100 xg durante 10 minutos, se trató con cloruro de dansil (20 mg/ml) según el método de Seiler (1970). Luego de agregar 50 µl de prolina (100 mg/ml) para frenar la dansilación y eluir con 400 µl de tolueno, con el objeto de separar e identificar por T.L.C. los derivados dansilados, se sembró en placas de sílica gel usando como sistema de solventes cloroformo: trietilamina (9:1) (Pegg y McCann, 1988). Se identificaron las poliaminas dansiladas con luz U.V., se rasparon las placas y se diluyeron con 2 ml de acetato con 2 gotitas de metanol. La fluorescencia de estas dansil - poliaminas, se cuantificó en un espectrofluorómetro Jasco modelo FP (excitación: 360 nm, emisión 510 nm). Los contenidos endógenos de poliaminas libres se expresaron en nmoles de poliaminas por gramo de tejido.

Ensayo de la actividad de proteína quinasa C (PKC) dependiente de calcio y fosfolípidos. El ensayo se realizó según el método de Schwarzbaum y col (1992) con modificaciones. El hígado fresco se homogeiniza en buffer conteniendo Tris- HCl 20 mM (pH 7.5), sacarosa 250 mM, EGTA 1 mM, EDTA 2 mM, NONIDET P- 40 1%, PMSF 1 mM y leupeptina 20 µg/ml en relación 1/3. Para hallar la actividad de PKC total (membrana + citosol), se trata el homogenato con dioleína en una concentración final de 2.5 µM, durante 30 min a 30 °C. Se centrifuga a 12.000 xg durante 20 minutos y el sobrenadante se ultracentrifuga a 100.000 xg durante 1 hora para extraer microsomas. Los microsomas se resuspenden en Tris-HCl 10 mM (pH 4.5) con Tritón X-100 0.5% durante 15 minutos a temperatura ambiente para solubilizar la enzima. Luego se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se usa para medir la actividad enzimática. Los liposomas se preparan mezclando la fosfatidilserina y la dioleína disueltas en etanol (2.5 y 1,.25 µg/tubo respectivamente), evaporando luego el etanol con N₂ gaseoso y resuspendiendo en una mezcla de sales conteniendo MgCl₂ 100 mM, Tris-HCl 200 mM(pH 7.45) y CaCl₂ 10 mM. Seguidamente se sonicán 3 veces durante 40 segundos. La mezcla de

incubación se prepara con 60 µg de enzima solubilizada en 30 µl de mezcla de liposomas y péptido sustrato 8µM. La reacción comienza por el agregado de ATP/ [γ - 32 P-ATP] 100 µM, 2.25 µCi/tubo y se incuba durante 20 minutos a 30 °C, con agitación. La reacción se detiene con 200 µl de H₃PO₄ 75 mM frío/tubo, se vortexean y luego se filtran a través de papel de fosfo celulosa P - 81. Se lavan 3 veces con 10 ml de H₃PO₄ 75 mM y los filtros se secan a 80 °C durante 1 hora. Los papelitos se colocan en líquido centellante y se mide la radioactividad en contador beta. La actividad se expresa en pmol de fosfato incorporado por minuto por mg de proteína. Para preparar los ensayos de blanco, se omitió a los activadores de la enzima (fosfatidilserina, dioleína y calcio), la mezcla de reacción con enzima y sustrato se preincubaba durante 10 minutos a 30 °C para agotar a los activadores endógenos de las membranas y la reacción comenzaba por el agregado de ATP/ [γ - 32 P-ATP] 100 µM, 2.25 µCi/tubo.

Determinación de proteínas. La concentración de proteínas fue medida por el método de Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina como estándar.

Análisis estadísticos. Los datos de los experimentos de curvas de dosis y de tiempo fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Otros análisis estadísticos fueron realizados con el test de Student como se indicó en el texto. Las diferencias entre animales controles y tratados se consideraron significativas cuando los valores de P fueron < 0.05.

RESULTADOS

CAPITULO I.

EL HEXACLOROBENCENO ALTERA LAS FUNCIONES DE MEMBRANA HEPÁTICA.

A) Estudios en función del tiempo.

El hígado es un órgano blanco para tóxicos tipo dioxina en muchas especies (Mc Connell y Moore, 1979). El incremento del tamaño del hígado como respuesta a la intoxicación por HCB y otros tóxicos aromáticos polihalogenados, se debe fundamentalmente a una hiperplasia e hipertrofia de las células parenquimáticas, especialmente por proliferación del retículo endoplasmático liso, acompañados de un incremento en la actividad de monooxigenasas microsomales (Fowler y col., 1973). Otros autores observaron que el aumento del tamaño del hígado con TCDD, no sólo reflejaba una inducción enzimática, sino también cambios en el contenido lipídico (Birnbaum, 1994).

Para estudiar si los cambios observados *in vivo* sobre el índice hepatosomático (IH) se relacionaban con otros parámetros de intoxicación inducidos por HCB, evaluamos los niveles de tiroxina séricos en función del tiempo de administración. La **Tabla 1** muestra que el peso del hígado aumenta en función del tiempo de administración de HCB, así como el IH, mientras que los niveles séricos de T₄ disminuyen desde muy cortos tiempos de exposición, (2 días), llegando a valores mínimos a los 20 días de tratamiento. El tiempo de 30 días fue elegido, teniendo en cuenta resultados de nuestro y otros laboratorios (Kleiman de Pisarev y col., 1989; 1990; San Martín de Viale y col., 1976) en los que se demostraba que el HCB administrado diariamente inducía porfiria hepática en ratas.

Tabla 1.

Efecto del tiempo de administración de HCB sobre el peso corporal, el peso del hígado, el índice hepatosomático (IH) y los niveles séricos de T₄.

	Peso corporal (g)	Peso del hígado (g)	IH ^a	Niveles de T ₄ (µg/dl)
CONTROL	216.2 ± 7.8	7.94 ± 0.30	3.71 ± 0.18	5.00 ± 0.40
HCB- 2 días	182.3 ± 20.8	7.21 ± 0.05	4.04 ± 0.67	4.00 ± 0.30*
5	179.7 ± 6.8	9.83 ± 1.04*	5.46 ± 0.41**	2.30 ± 0.40**
10	179.2 ± 4.3	9.73 ± 0.47**	5.44 ± 0.26**	1.50 ± 0.15**
20	207.5 ± 0.7	16.55 ± 0.35**	7.97 ± 0.15**	1.35 ± 0.10**
30	220.6 ± 9.2	10.72 ± 0.48**	4.89 ± 0.32**	1.30 ± 0.09**

Efecto del tiempo de administración de HCB (100 mg/100 g p.c.) sobre el peso corporal, el peso del hígado, el índice hepatosomático y los niveles de tiroxina séricos. Los datos provienen de tres a cinco animales por grupo en cada tiempo ensayado.

^aÍndice hepatosomático: [peso del hígado (g) / peso corporal (g)] × 100.

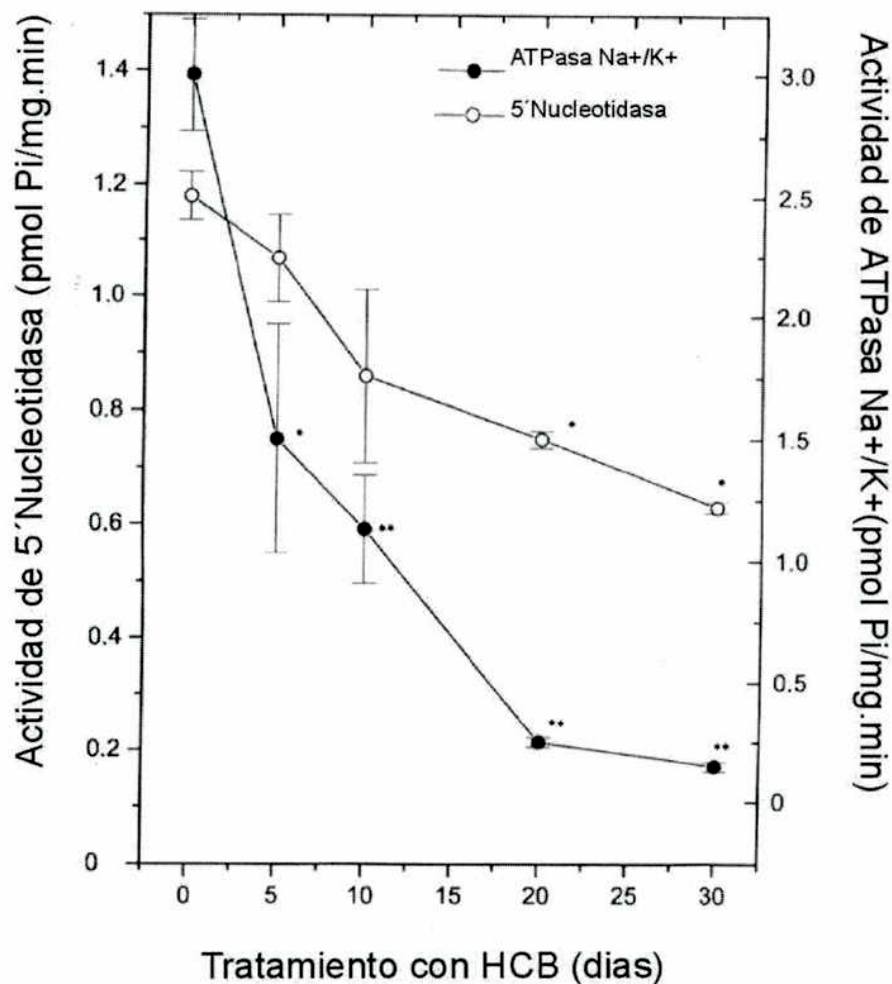
Los valores representan las medias ± ES. Las medias significativamente diferentes a los controles con (P < 0,05) son designados con * y las que tienen (P < 0,005) son designadas con **.

A1-Cambios bioquímicos de la membrana microsomal hepática

Para estudiar los cambios producidos por la administración de HCB en parámetros funcionales de membrana hepática, evaluamos la actividad de dos enzimas marcadoras de la integridad de membrana como la ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente y la 5'Nucleotidasa.

Como se muestra en la **Figura 1**, la administración de HCB (100 mg/100 g p.c.), produjo una significativa disminución de la actividad de ambas enzimas, siendo la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente, el parámetro más sensible. El efecto sobre la actividad de la 5'Nucleotidasa fue significativo recién a los 20 días de intoxicación.

Figura 1.



Efecto del tiempo de intoxicación con HCB (100 mg/100 g p.c.) sobre las actividades específicas de (A) ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente y (B) 5'Nucleotidasa de membrana hepática. Los valores se representan como las medias $\pm$ ES, (N=3). Los valores significativamente diferentes de los controles, con valores de $P < 0,05$ son designados por * y con valores de $P < 0,0005$ son designados por **. Los valores controles no fueron alterados por la administración del vehículo hasta los 30 días.

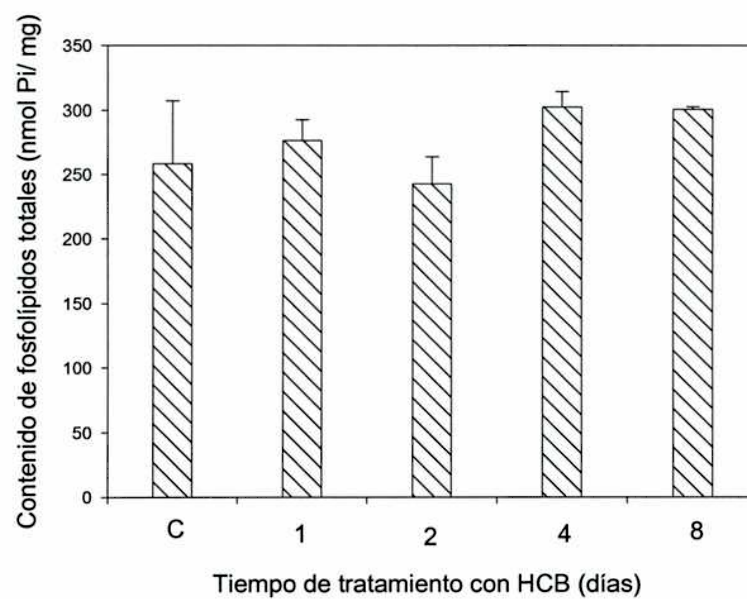
A2- Contenido de fosfolípidos.

La importancia del estudio de los cambios en el contenido fosfolipídico de membranas hepáticas, en la toxicología de los compuestos aromáticos polihalogenados, se debe a que: a) las enzimas que metabolizan xenobióticos se encuentran en el retículo endoplasmático liso y su función necesita de fosfolípidos (Cantoni y col., 1987); b) estos tóxicos se intercalan dentro de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, incrementando la fluidez de la misma, pudiendo así alterar su funcionalidad (Kószó y col, 1982); c) en el mecanismo de acción de estos tóxicos, están involucradas principalmente las PTKs y PKC y que dentro de la transducción de señales mediadas por estas enzimas, intervienen algunos fosfolípidos como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS).

La **Figura 2** muestra que los fosfolípidos totales no sufrieron cambios importantes en función del tiempo de tratamiento, hasta los 8 días.

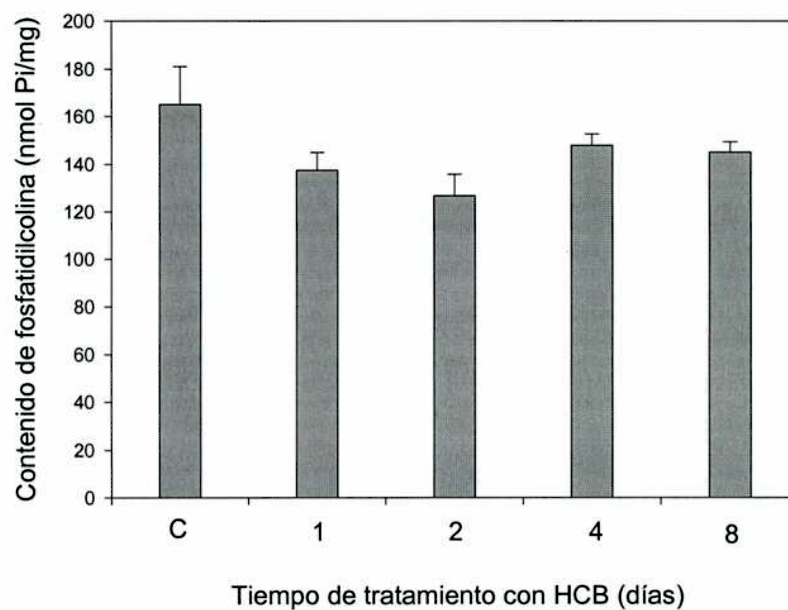
En la **Figura 3 y 4**, se observa que el contenido de **Fosfatidilcolina (PC)** y el de **Fosfatidiletanolamina (PE)** descendieron no significativamente a los 2 días de tratamiento. En cambio, los niveles de **Fosfatidilinositol (PI)**, se redujeron significativamente por efecto del HCB, a los 2 días de tratamiento (**Figura 5**). Ni la **Fosfatidilserina (PS)** (**Figura 6**), ni la **Esfingomielina (SPH)** (**Figura 7**), se alteraron en forma significativa, aunque se observó una tendencia a la disminución a 1 y 2 días.

Figura 2.



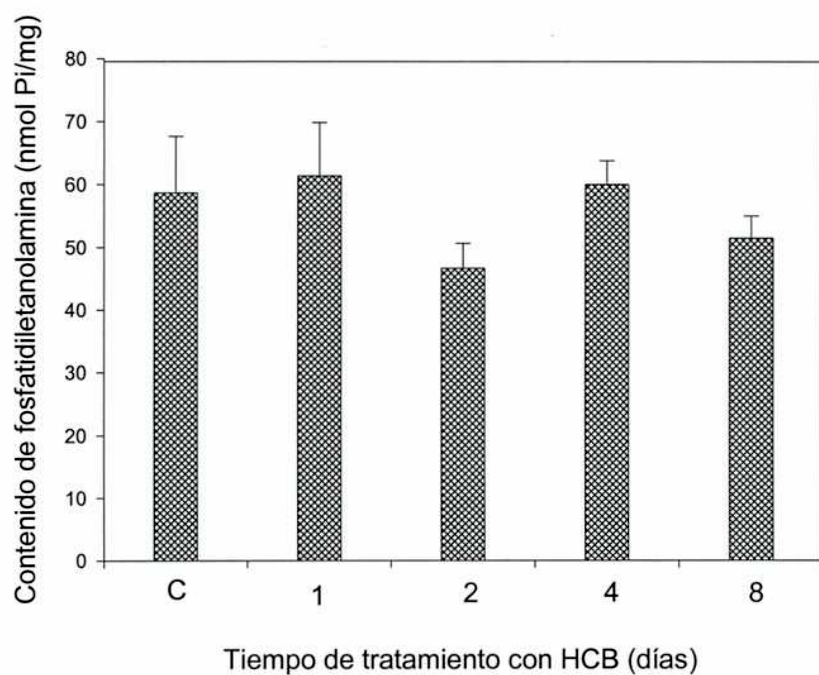
Contenido de fosfolípidos totales en microsomas hepáticos. Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

Figura 3.



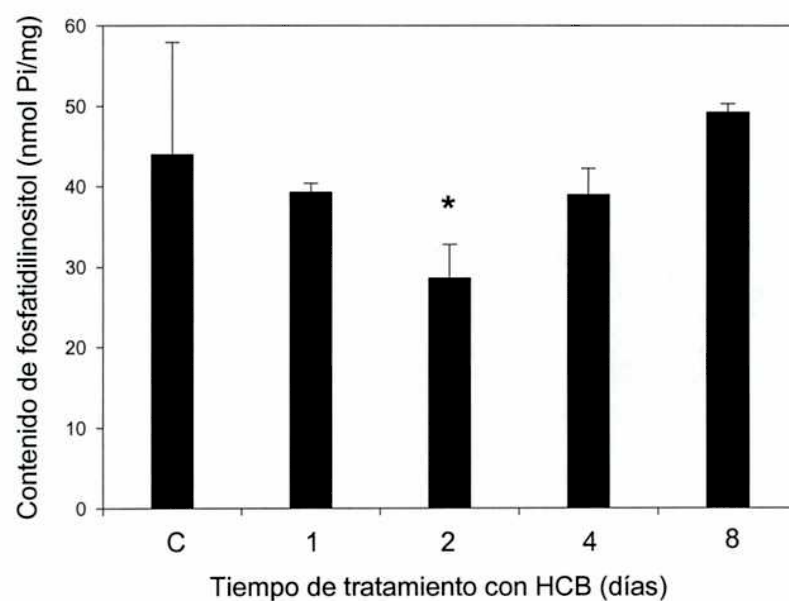
Niveles endógenos de Fosfatidilcolina (PC) en microsomas hepáticos . Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

Figura 4.



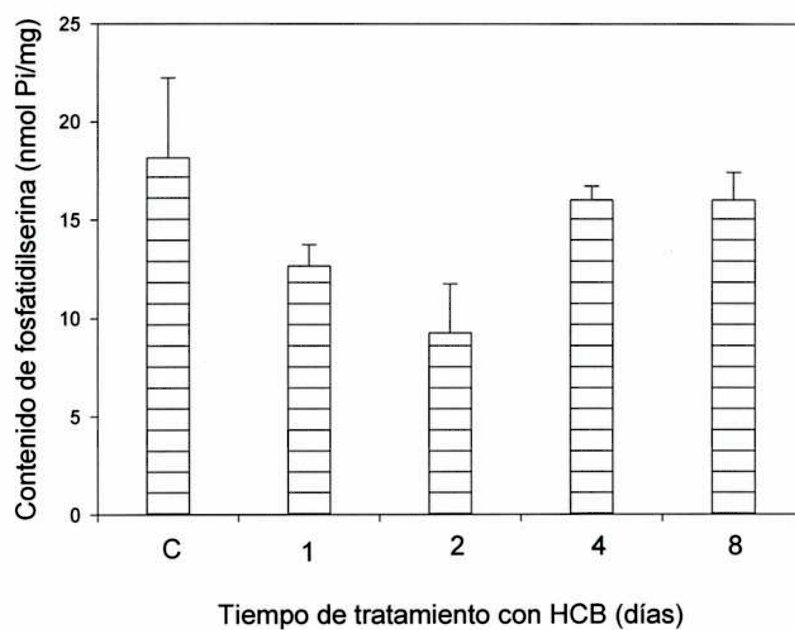
Contenido endógeno de Fosfatidiletanolamina (PE) en microsomas hepáticos . Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

Figura 5.



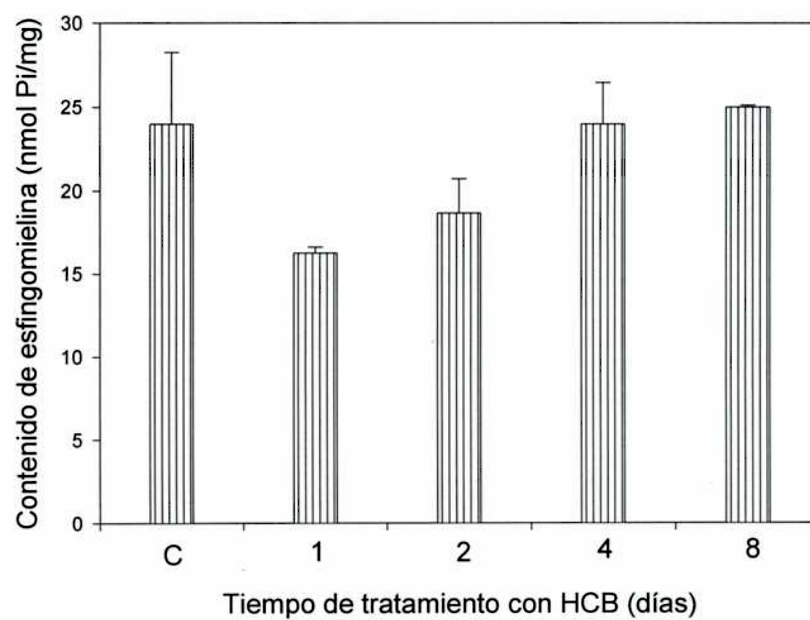
Niveles endógenos de Fosfatidilinositol (PI) en microsomas hepáticos. Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

Figura 6.



Contenido endógeno de Fosfatidilserina (PS) en microsomas hepáticos. Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

Figura 7.



Niveles endógenos de Esfingomielina (SPH) en microsomas hepáticos. Las ratas fueron intoxicadas con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1, 2, 4 y 8 días. Los lípidos se extrajeron con cloroformo:metanol y luego se separaron por cromatografía en capa delgada, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N= 3).

A3- Efecto del HCB sobre la fosforilación de proteínas de membrana.

Para estudiar si el HCB administrado *in vivo*, afecta a la fosforilación de proteínas endógenas de membrana hepática, en función del tiempo de intoxicación, se extrajeron microsomas hepáticos de animales tratados durante diferentes períodos de tiempo, y se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP en presencia o ausencia de inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 y NaF). El ortovanadato de sodio es un inhibidor de fosfatasa, con preferencia relativa para residuos de fosfotirosina (Swarup y col., 1982) y también puede estimular algunas quinasas de tirosina (Girault, 1994); mientras que el fluoruro de sodio es un inhibidor de fosfatasa de serina y treonina. Las fosfoproteínas marcadas, fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografía.

El HCB alteró la fosforilación de proteínas de membrana, en una manera dependiente del tiempo de administración, observándose un rápido y notable incremento en la fosforilación de proteínas de 108, 81, 72, 60, 50 y 45 Kd con un máximo efecto a los 5 días; y una disminución en las bandas de 138-140 y 129 Kd (**Figura 8**).

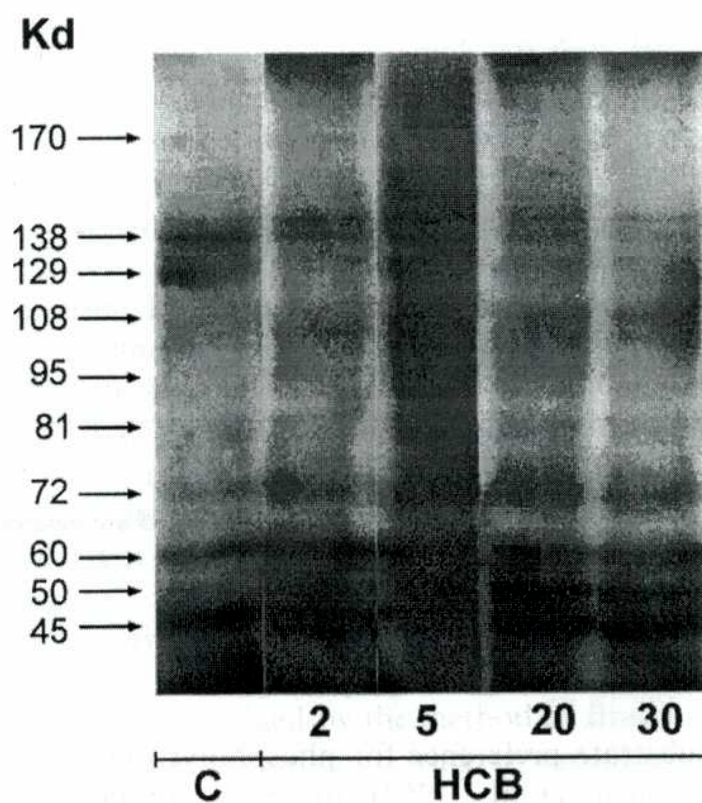
El ensayo de fosforilación *in vitro*, en presencia de inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 y NaF , **Figura 9 A**) mostró una disminución general en la fosforilación de proteínas, tanto en muestras provenientes de animales controles como en las muestras de animales tratados con HCB durante 5 días. Sin embargo, se puede observar que el efecto de los inhibidores de fosfatasa fue menor sobre las fosfoproteínas de 170, 138 y 108 Kd, mientras que se mantuvo alta la incorporación en la de 45 Kd.

Otros ensayos realizados a los 10 días de tratamiento con HCB (100 mg/100 g p.c.), mostraron que, en presencia de ortovanadato de sodio solo, se incrementó la fosforilación de una gran cantidad de fosfoproteínas: 170, 108,

81, 72, 50, 45 y 21 Kd (**Figura 9 B**), mientras que en presencia de ortovanadato y fluoruro de sodio hubo una disminución general de la fosforilación. El patrón de fosforilación de algunas proteínas, por ejemplo 60 y 50 Kd no fue consistente y varió de una corrida electroforética a otra.

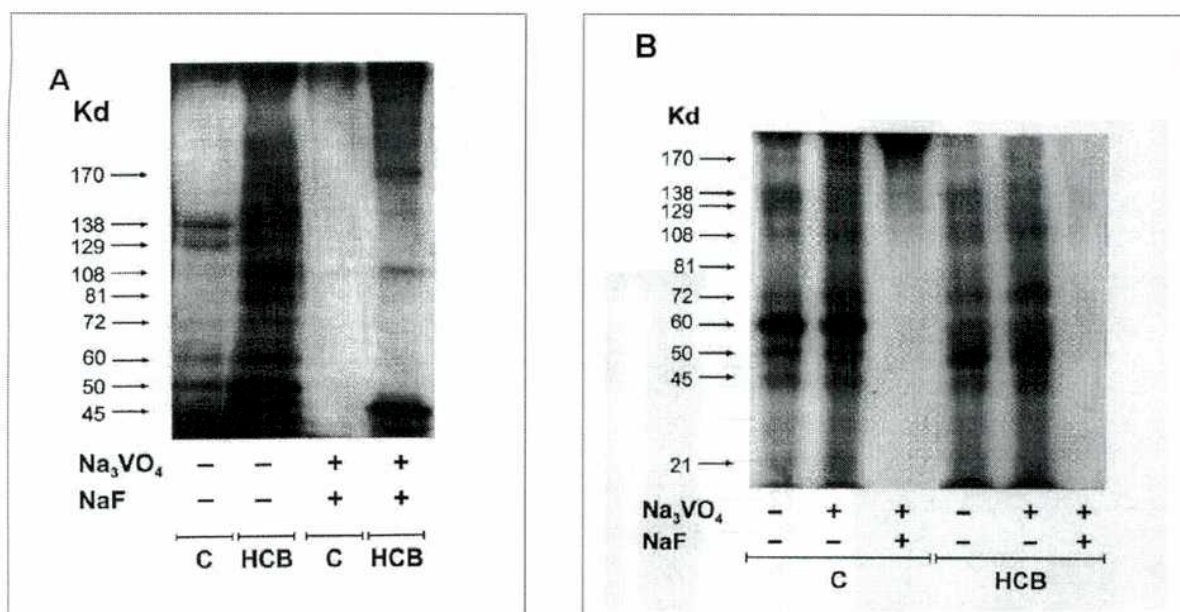
Estos resultados muestran por primera vez alteraciones en la fosfo-defosforilación de proteínas endógenas de membrana por efecto del HCB. Estas modificaciones, podrían 1- estar relacionadas con fenómenos de transducción de señales, y 2- estar involucrados en el efecto pleiotrópico del pesticida. Por otra parte, es importante señalar que las modificaciones en la fosfo-defosforilación de proteínas ocurren desde tiempos muy tempranos de administración (2 días), momento en el cual comienza a ser significativa la disminución de T₄.

Figura 8.



Efectos de la intoxicación *in vivo* con HCB (100 mg/100 g p.c.) sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas microsomales hepáticas reveladas por autorradiografía. Las membranas microsomales se prepararon a partir de hígados de animales control y tratados con HCB, durante 2, 5, 20 y 30 días. C: animales control y HCB: animales tratados.

Figura 9.



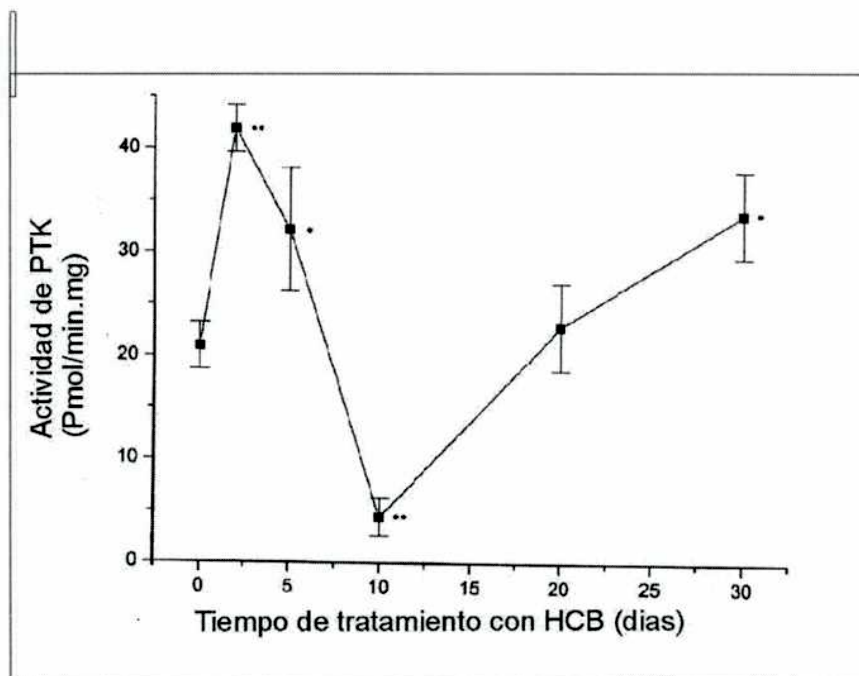
Efecto de los inhibidores de fosfatasa, sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas endógenas microsomales hepáticas, determinadas por autorradiografía. (A) Las membranas microsomales provenientes de animales tratados durante 5 días con HCB (100 mg/100 g p.c.), fueron fosforiladas con [γ -³²P] ATP en presencia (+) o ausencia (-) de inhibidores de fosfatasa: ortovanadato de sodio (200 μ M) y fluoruro de sodio (50 mM). (B) Membranas de animales tratados con HCB durante 10 días y fosforiladas en presencia (+) y ausencia (-) de inhibidores de fosfatasa: ortovanadato de sodio sólo y ortovanadato + fluoruro de sodio. C: animales control, HCB: animales tratados.

A4- Efecto del tratamiento con HCB sobre la actividad de quinasas de tirosina (PTKs).

En base a los resultados anteriores, que muestran que el tratamiento con HCB *in vivo* produce cambios en la fosforilación de proteínas de membrana, examinamos la actividad de quinasas de tirosina (PTKs) usando un sustrato artificial específico como el poli [Glu⁸⁰Na, Tir²⁰] a diferentes tiempos de intoxicación.

Los resultados señalaron que el HCB (100 mg/100 g p.c.) indujo importantes modificaciones dependientes del tiempo de administración, en la actividad de PTKs de membrana microsomal (**Figura 10**). A tiempos cortos de intoxicación, el HCB aumentó significativamente la actividad de PTKs (100 % a 2 días y 60 % a 5 días), mientras que a los 10 días hubo una disminución del 78 % en la actividad. A los 20 días la actividad retornaba a los niveles control y se incrementaba significativamente a los 30 días (50%).

Figura 10.



Alteraciones dependientes del tiempo de administración de HCB (100 mg/100 g p.c.) sobre la actividad de quinasas de tirosina (PTK) microsomales hepáticas. La actividad de PTKs fue evaluada usando poli-Glu-Tir como sustrato, como se detalla en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media $\pm$ ES, (N = 3). Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ son designados con * y los valores con $P < 0,005$, con **.

A5- La administración de HCB modifica la unión del EGF a sus receptores de membrana hepática.

Se ha sugerido que los compuestos tipo-dioxina, luego de su unión al receptor citosólico Ah, desencadenan una activación de la vía de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento (Matsumura, 1994).

Se midió el efecto del HCB (100 mg/100 g p.c.), sobre la unión del EGF a su receptor de membrana, a los 10 días de intoxicación, tiempo en el que observamos una fuerte reducción en la actividad de PTKs de membrana. Asimismo, este corto período de administración de HCB, no estaba asociado a una toxicidad manifiesta, como podría ser el desencadenamiento de porfiria, como la que se observa en los modelos de intoxicación crónica (30-60 días) (Kleiman de Pisarev y col., 1990).

Nuestros resultados mostraron que a 10 días de tratamiento con HCB, disminuyó significativamente la unión del [125 I] EGF a sus receptores de membrana hepática. El análisis de Scatchard de la unión ligando -receptor, exhibía una curva bifásica indicativa de dos clases de receptores para EGF con diferentes afinidades. En los animales tratados con HCB, la concentración de los receptores de baja afinidad y la afinidad de los receptores de alta afinidad se redujo, comparado con los valores de los controles (**Tabla 2**).

Tabla 2.

Características de los receptores de membrana del EGF.

	B_{max}	K_{a1}
CONTROL	942 fmol/mg	24.25 nM ⁻¹
HCB	554 fmol/mg	12.74 nM ⁻¹

Efecto del HCB (100 mg/100 g p.c.) administrado *in vivo* durante 10 días, sobre los parámetros de B_{max} y K_a de los receptores hepáticos de EGF. La B_{max} se expresa en fmoles/mg, mientras que la K_a se expresa en nM⁻¹.

B) Cambios dependientes de la dosis de administración de HCB.

Para estudiar si los cambios observados en función del tiempo, eran también dependientes de la dosis de administración de HCB, diseñamos un ensayo de dosis-respuesta a los 10 días de intoxicación, momento en que habíamos encontrado una fuerte disminución de la actividad de PTKs y de la unión del EGF a sus receptores de membrana en ratas tratadas con HCB (100 mg/100 g p.c.). En la **Tabla 3**, se observan los cambios producidos sobre el peso corporal, el peso del hígado, el índice hepatosomático y los niveles de T₄ séricos. El peso del hígado y el índice hepatosomático aumentaron en forma significativa a 50 y 100 mg/100 g p.c. de HCB, mientras que a esas mismas dosis hubo una disminución significativa de los niveles de T₄ séricos.

Tabla 3.

Efecto de la dosis de administración de HCB (mg/100 g p.c.), sobre el peso corporal, el peso del hígado, el índice hepatosomático (IH) y los niveles séricos de T₄.

	Peso corporal (g)	Peso del hígado (g)	IH ^a	Niveles de T ₄ (μg/dl)
CONTROL	190.0 ± 0.2	6.48 ± 0.36	3.39 ± 0.12	5.50 ± 1.00
HCB- 10	186.8 ± 4.6	7.16 ± 0.70	3.83 ± 0.37	4.50 ± 0.50
50	194.2 ± 4.2	8.70 ± 0.69*	4.47 ± 0.31*	3.00 ± 0.60*
100	192.7 ± 7.6	9.25 ± 0.61**	4.82 ± 0.31**	2.00 ± 0.60*

Efecto de la dosis de HCB (0, 10, 50 y 100 mg/100 g p.c.) sobre el peso corporal, el peso del hígado, el IH y los niveles de tiroxina séricos. Los datos provienen de tres a cinco animales por grupo. ^aÍndice hepatosomático: [peso del hígado (g) / peso corporal (g)] x 100.

Los valores representan las medias ± ES. Las medias significativamente diferentes a los controles con (P < 0,05) son designados con * y las que tienen (P < 0,005) son designadas con **.

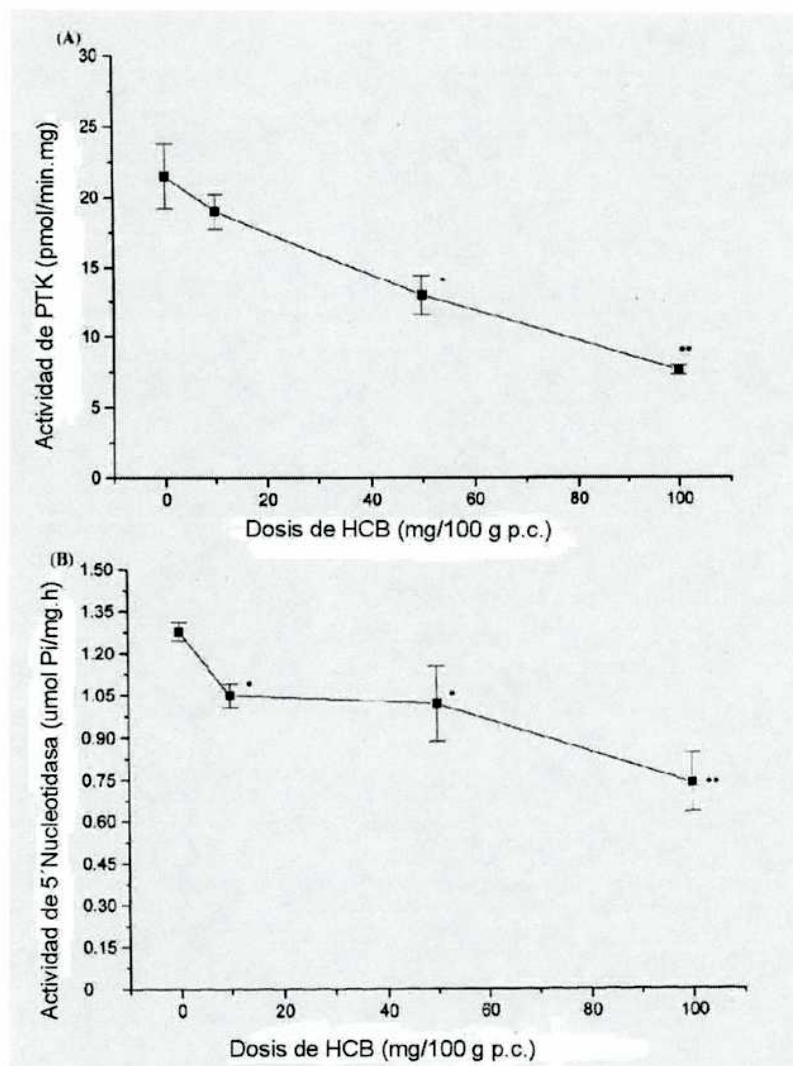
B1- Efecto de la dosis de HCB sobre la actividad de PTKs y de 5'Nucleotidasa.

La actividad de PTKs disminuyó significativamente (40 %) a partir de 50 mg/100 g p.c., mientras que la actividad de la 5'Nucleotidasa fue más sensible a la acción del HCB, disminuyendo significativamente a 10 mg/100 g p.c. (Figura 11).

B2- El HCB altera la fosforilación de proteínas de manera dosis dependiente.

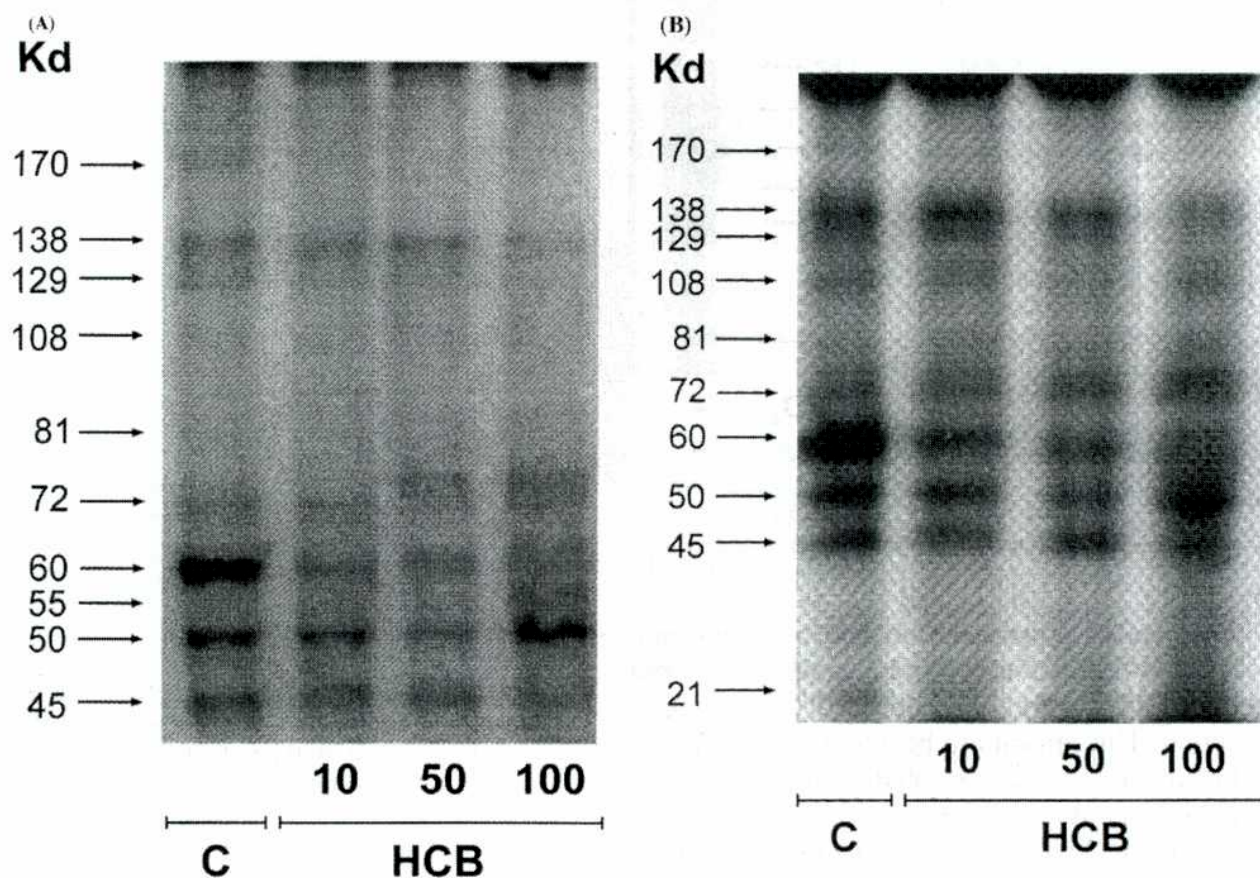
La fosforilación de proteínas hepáticas, también fue afectada por HCB en forma dependiente de la dosis (**Figura 12 A y 12 B**), observándose un incremento en la fosfoproteína de 72 Kd, mientras que las bandas de 129 y 138 Kd decrecieron a 100 mg/100 g p.c. La fosfoproteína de 60 Kd, la más conspicua en muestras control, presentó los cambios más notables con el efecto del pesticida, ya que disminuyó a la dosis de 10 mg/100 g p.c. La proteína de 50 Kd, se encontró reducida a 50 mg/100 g p.c., revirtiéndose el efecto hasta valores mayores que los controles, con la dosis máxima.

Figura 11.



Cambios dependientes de la dosis de HCB (10 , 50 o 100 mg/100 g p.c.) en: (A) las actividades de quinasas de tirosina (PTKs) y (B) 5'Nucleotidasa hepáticas, a los 10 días de intoxicación. La actividad de PTKs fue evaluada usando poli -Glu-Tir como sustrato, como se detalla en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media $\pm$ ES, (N = 3). Los valores significativamente diferentes de los controles con $P < 0,05$ se designan con * y los valores con $P < 0,005$ se designan con **.

Figura 12.



La administración *in vivo* de HCB (10, 50 o 100 mg/100 g p.c.) durante 10 días, altera la fosforilación de proteínas endógenas microsomales hepáticas, determinadas por autorradiografía. (A) Las proteínas microsomales fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 7,5 %. Cada calle fue sembrada con 17 μ g de proteína. (B) Las proteínas microsomales fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 10 %. Cada calle fue sembrada con 34 μ g de proteína. C: animales control, HCB: animales tratados; 10, 50 y 100: mg de HCB/ 100 g p.c.

En resumen.

En este primer estudio, observamos que la administración de HCB *in vivo*, afectaba a varios parámetros bioquímicos de función de membrana, en forma dependiente del tiempo y de la dosis administrada.

Para algunos parámetros, el tiempo de 10 días es clave, ya que por ejemplo, la actividad de PTKs y la unión del EGF a sus receptores de membrana, estaban disminuidas con HCB (100 mg/100 g p.c.), mientras que a otros tiempos la actividad de PTKs estaba estimulada.

Con respecto a los estudios dependientes de la dosis, los cambios estudiados más evidentes fueron: la actividad de 5'nucleotidasa y la fosforilación de proteínas endógenas, que se modificaron en los animales tratados con dosis de 10 mg/100 g p.c. de HCB. A esta dosis, la p60 sufrió una brusca disminución en su incorporación de ^{32}P . Luego, a 50 mg/100 g p.c. de HCB, se alteraron de forma significativa la actividad de PTKs, el índice hepatosomático y los niveles séricos de tiroxina.

CAPITULO II.

RELACIÓN DOSIS-EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y EL CONTENIDO DE FOSFOTIROSINA DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS.

SU RELACIÓN CON LA HIPOTIROXINEMIA Y LA PORFIRIA.

En esta sección del trabajo, investigamos los efectos dependientes de la dosis de administración de HCB a 30 días, sobre parámetros bioquímicos relacionados con la transducción de señales del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF) y la vía de fosfotirosina, relacionándolos con alteraciones características producidas por estos tóxicos: como los cambios en el metabolismo de hormonas tiroideas y la porfiria hepática.

A- Efectos de la administración crónica de HCB sobre los pesos corporales y hepáticos, índice hepatosomático y niveles séricos de hormonas tiroideas.

Para investigar la dependencia de la dosis de los efectos estudiados, en animales intoxicados en forma crónica (30 días), se evaluaron los índices hepatosomáticos (IH) y los niveles de hormonas tiroideas. Se realizaron los estudios desde dosis muy bajas de intoxicación (0.1 mg/100 g p.c.). Las dosis de HCB ensayadas fueron 0.1, 10 y 100 mg/100 g p.c.

Pudimos observar que sólo la mayor dosis de HCB (100 mg/100 g p.c.) produjo una disminución significativa de los niveles de tiroxina y un incremento del peso del hígado y del IH (**Tabla 4**).. Con respecto a los niveles de T₃, no se encontraron cambios en las dosis analizadas, mientras que en los niveles séricos de T₄ se observó una reducción significativa a la dosis mayor del pesticida. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, encontramos que una dosis de HCB de 50 y 25 mg/100 g p.c., administrada durante 10 y 30 días

respectivamente, disminuyó significativamente los niveles de T₄. (Kleiman de Plsarev y col., 1990).

Tabla 4.

Efecto de la dosis de administración de HCB (mg/100 g p.c.), sobre el peso corporal, el peso del hígado, el índice hepatosomático (IH) y los niveles séricos de T₃ y T₄.

	Peso corporal (g)	Peso hígado (g)	IH ^a	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (μg/dl)
CONTROL	211.00 ± 10	6.74 ± 0.48	3.18 ± 0.12	77 ± 5	3.2 ± 0.50
HCB- 0.1	201.17 ± 3.91	7.12 ± 0.51	3.53 ± 0.22	74 ± 6	3.0 ± 0.90
10	200.33 ± 3.59	7.02 ± 0.41	3.49 ± 0.15	70 ± 7	2.8 ± 0.70
100	194.00 ± 4.59	8.97 ± 0.26*	4.64 ± 0.18**	60 ± 9	1.2 ± 0.5*

Efectos de la administración de HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/100 g p.c.) durante 30 días, sobre el peso corporal, peso del hígado, IH y niveles séricos de T₃ y T₄.

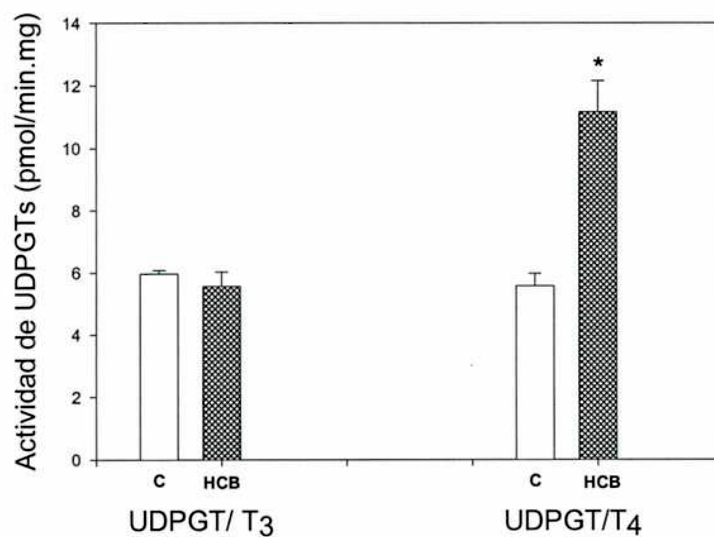
^aÍndice hepatosomático: [peso hígado (g) / peso corporal (g)] x 100. Los valores se representan como medias ± ES, (N = 6). Las medias significativamente diferentes a los controles con P < 0,05 se designan con * y las medias con P < 0,0005 se designan con **.

B- Efecto del HCB sobre las actividades de UDPGTs para T₄ y T₃.

Con el objetivo de determinar si la disminución de los niveles séricos de tiroxina y el mantenimiento de triiodotironina, observados en el tratamiento con HCB (100 mg/100 g p.c.), provenían de cambios en el metabolismo de dichas hormonas, estudiamos la actividad de UDPGTs para T₄ y T₃. Las UDPGTs son las enzimas responsables de la glucuronidación de las hormonas tiroideas antes de su excreción biliar. Nuestros resultados muestran que la actividad de UDPGT para T₄ aumentó en un 100 % por efecto del HCB (100 mg/100 g p.c.) a los 30 días de intoxicación, mientras que la actividad de UDPGT para T₃ no se

modificó (**Figura 13**). Estos cambios sugieren que una excreción biliar aumentada de T₄ sería al menos en parte responsable de los niveles disminuídos de T₄ séricas en las ratas intoxicadas.

Figura 13.



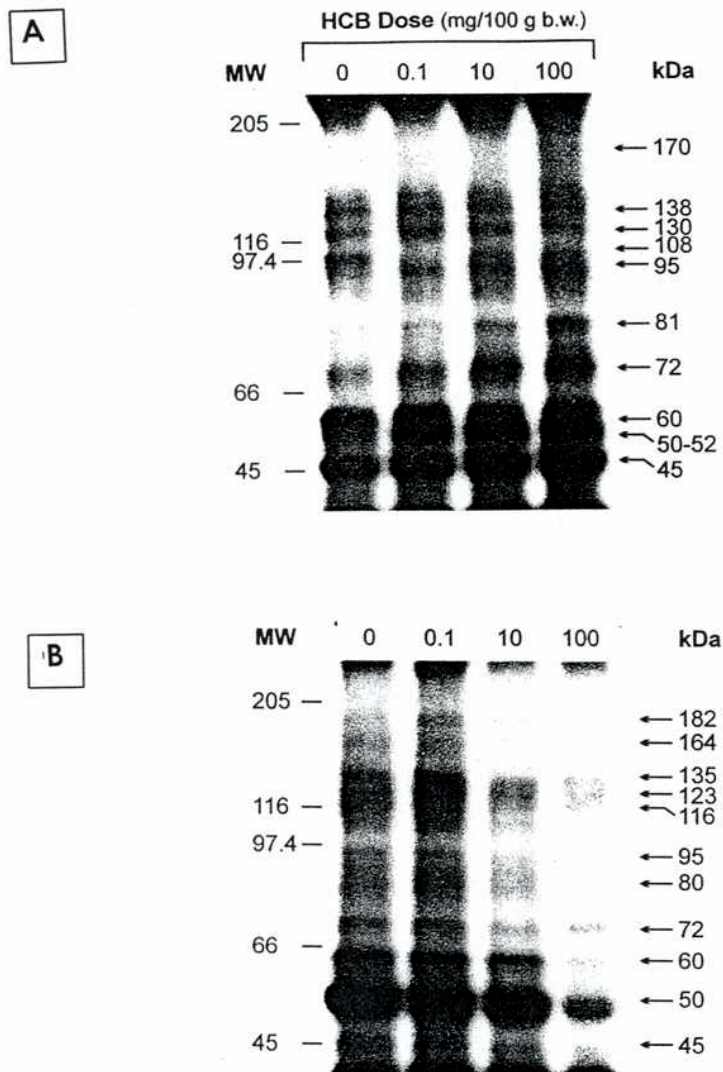
Efecto del HCB (100 mg/100 g p.c.) a 30 días de intoxicación, sobre las actividades de UDPGT-T₃ y UDPGT-T₄ microsomaes hepáticas. La actividad enzimática se expresa como pmol de glucurónido formado por mg de proteína microsomal por minuto. Los valores representan las medias $\pm$ ES, (N = 3). Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$, se designan con *.

C- Fosforilación *in vitro* de proteínas hepáticas.

Se fosforilaron proteínas de citosol y membrana microsomal de hígados provenientes de animales intoxicados durante 30 días, con HCB a 0.1, 10 y 100 mg/100 g p.c. Observamos que el HCB modificó la fosforilación de proteínas microsomales de manera dependiente de la dosis: con alteraciones en la fosforilación de las proteínas de 138, 130, 95, 81, 72, 60 y 50- 52 Kd con una máxima estimulación en la fosforilación de las proteínas de 138, 130, 60, y 50 -52 Kd a la menor dosis (0.1 mg/100 g p.c.) (**Figura 14 A**).

Los resultados en la fosforilación de proteínas citosólicas, mostraron notables modificaciones por efecto del pesticida, con un incremento significativo en las proteínas de 135, 123, 80 y 72 Kd a la menor dosis (0.1 mg /100 g p.c.), mientras que observamos una reducción general a las dosis de 10 y 100 mg/100 g p.c. La banda de proteína más conspicua fue la de 50 Kd, cuya marcación estaba fuertemente disminuida a la dosis máxima de HCB (**Figura 14 B**).

Figura 14.



Cambios dependientes de la dosis de administración *in vivo* de HCB, sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas endógenas hepáticas, determinadas por autorradiografía. Los animales recibieron tratamiento con HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/100 g p.c.) o vehículo, durante 30 días por intubación gástrica. Las proteínas fueron aisladas, fosforiladas *in vitro* con [γ - 32 P]-ATP y analizadas en geles de poliacrilamida al 7.5 %. (A) Proteínas microsomales; (B) proteínas citosólicas. Cada calle fue sembrada con 30 μ g de proteína; MW: proteínas marcadoras de peso molecular.

Dado nuestro interés, en el mecanismo de acción del tóxico sobre el camino de transducción de señales de fosfotirosina, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* en presencia de ortovanadato de sodio. Nuestros resultados indicaron que este inhibidor incrementó la fosforilación de algunas proteínas microsomales, tanto en las muestras provenientes de controles como de animales tratados con HCB (0.1 mg/100 g p.c.), mientras que un menor efecto fue observado a la máxima dosis. (**Figura 15 A**). Estos resultados coinciden con los observados a los 10 días de intoxicación (consultar páginas 75-77).

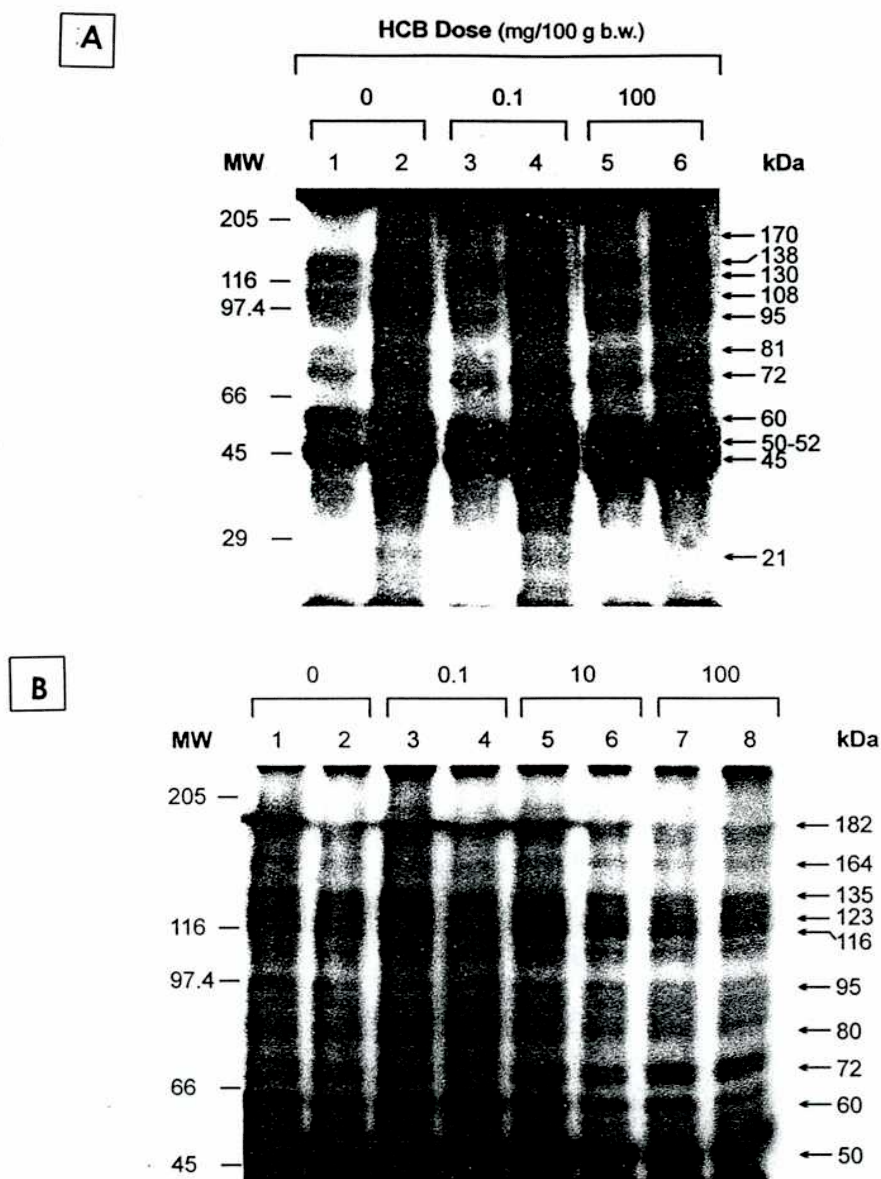
Por el contrario, en presencia de ortovanadato, observamos una disminución en la incorporación de fosfato, en las proteínas citosólicas, excepto en las muestras provenientes de animales tratados con HCB (100 mg/100 g p.c.) (**Figura 15 B**).

D- Niveles de receptor de EGF.

Dado que en los experimentos anteriormente descritos, encontramos que el HCB (100 mg/100 g p.c.), administrado durante 10 días, producía un descenso en la unión del EGF a sus receptores de membrana, y una fuerte disminución en la actividad de PTK, se evaluaron los niveles inmunodetectables de receptor de EGF, en un estudio de dosis a 30 días. Para evaluar la compartimentalización del REGF, aislamos microsomas y membranas plasmáticas y medimos el contenido de dicho receptor.

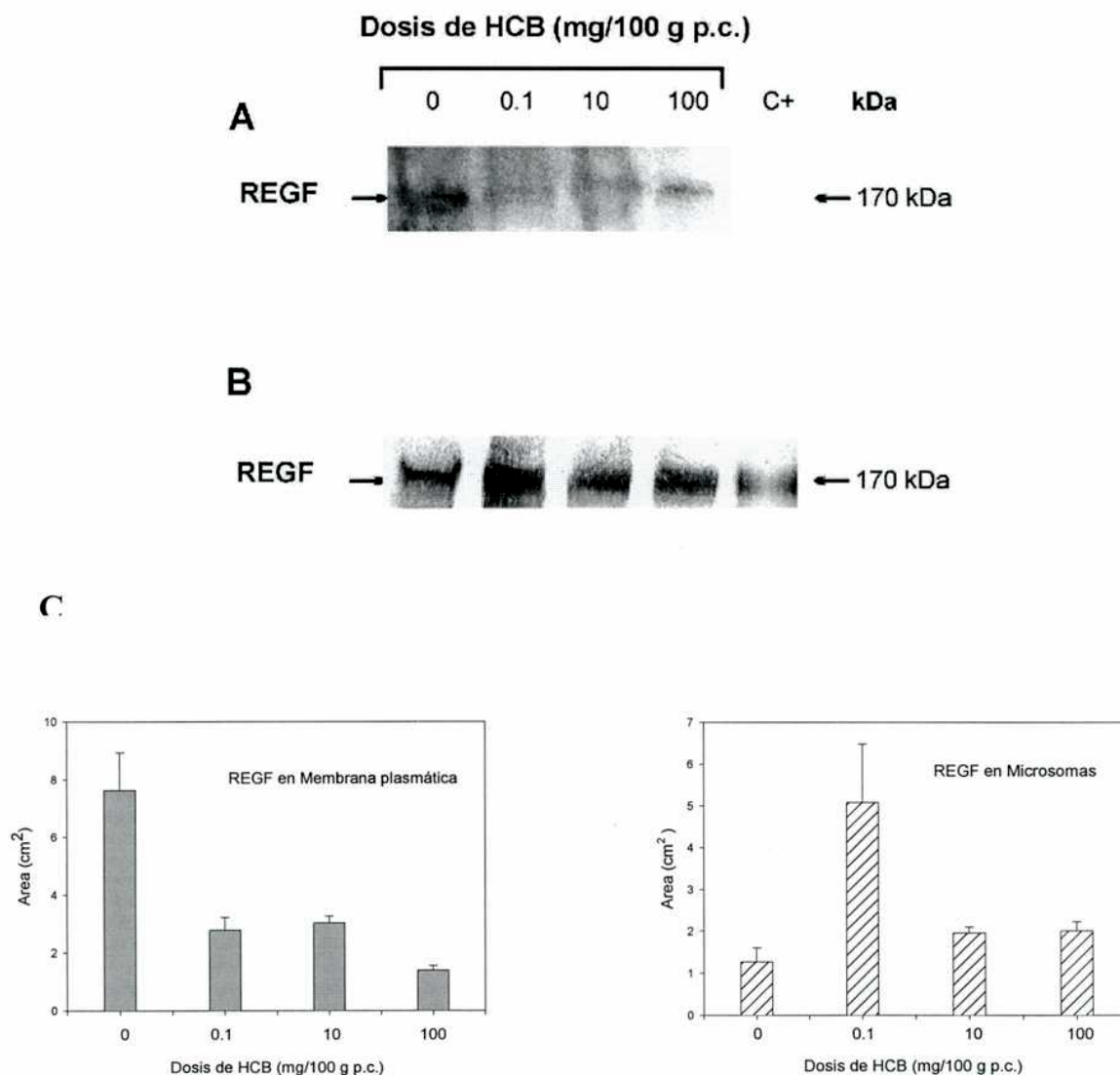
Los niveles de EGFRs medidos en membranas plasmáticas por inmunobl ot, usando un anticuerpo monoclonal anti EGFR, estaban disminuídos a todas las dosis ensayadas, con un mayor efecto a 0.1 mg/100 g p.c. (**Figura 16 A**). De manera inversa, los niveles inmunodetectables del receptor, medidos en preparaciones microsomales estaban incrementados, fundamentalmente a 0.1 mg/100 g p.c. (**Figura 16 B**).

Figura 15.



Efecto del ortovanadato de sodio, sobre la fosforilación *in vitro* de proteínas endógenas aisladas de animales intoxicados con diversas dosis de HCB (como se indica en la figura) durante 30 días. Las proteínas microsomales y citosólicas se fosforilaron en presencia o ausencia de Na_3VO_4 (200 μM), y se analizaron en geles de poliacrilamida. (A) Las proteínas microsomales se analizaron en geles de poliacrilamida al 10 %. Las calles 1, 3 y 5 en ausencia y las calles 2, 4 y 6 en presencia de ortovanadato de sodio. (B) Las proteínas citosólicas se analizaron en geles de poliacrilamida al 7,5 %. Las calles 1, 3, 5 y 7 en ausencia y las calles 2, 4, 6 y 8 en presencia de ortovanadato de sodio. MW: proteínas marcadoras de peso molecular.

Figura 16.



El HCB induce cambios dependientes de la dosis administrada, sobre los niveles inmunodetectables de receptor de EGF. Las dosis correspondientes de HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/100 g p.c.) o vehículo, fueron administrados por intubación gástrica durante 30 días. Las proteínas fueron resueltas en geles de poliácridamida al 7,5 % y los niveles de EGFR fueron detectados por inmunoblot usando un anticuerpo monoclonal. El segundo anticuerpo usado, fue hecho en cabra, contra ratón, conjugado con fosfatasa alcalina. (A) Detección inmunoquímica de los niveles de EGFR en proteínas de membrana plasmática y (B) en proteínas microsomales. C+: control positivo de lisado de células A-431 que sobreexpresan el receptor de EGF. (C) Escaneado densitométrico y representación en barras del porcentaje de cambio respecto del control. Los datos representan la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes.

E- Determinación de la actividad de quinasas de tirosina.

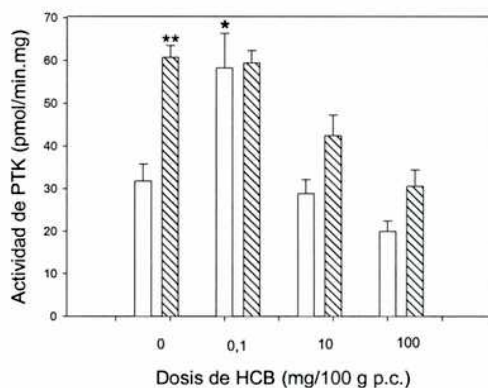
La **Figura 17 A** muestra la respuesta de la actividad de PTKs al estímulo por EGF (100 ng/100 μ l) adicionado *in vitro*, en membrana plasmática de ratas intoxicadas con diversas dosis de HCB. Notamos que la actividad de PTKs aumentó significativamente a la dosis de 0.1 mg/100 g p.c. de HCB, retornando a los valores controles con la dosis de 10 mg y una pequeña disminución, que se mantuvo constante en todos los ensayos realizados, pero que no llegó a ser significativa a 100 mg/100 g p.c.

El porcentaje de estimulación de la actividad de PTKs inducida por EGF en relación a la actividad de estas enzimas no estimuladas, muestra una inhibición casi total de la estimulación a 0.1 mg/100 g p.c. de HCB (**Figura 17 B**). Estos resultados sugieren que el HCB podría inducir una internalización de receptores, con una correlación negativa entre la internalización del receptor y la actividad de PTKs estimuladas por EGF, lo que supone que los receptores estarían internalizados, no estando disponibles para su unión al ligando. El notable incremento de la actividad de PTKs a 0.1mg/100 g p.c. de HCB, podría deberse a que con la fracción de membrana plasmática, se reclutarían endosomas tempranos, donde los REGFs estarían activados y no expuestos para el reconocimiento con el anticuerpo. También podría atribuirse a la presencia de otros receptores con actividad de PTK, como los receptores de insulina.

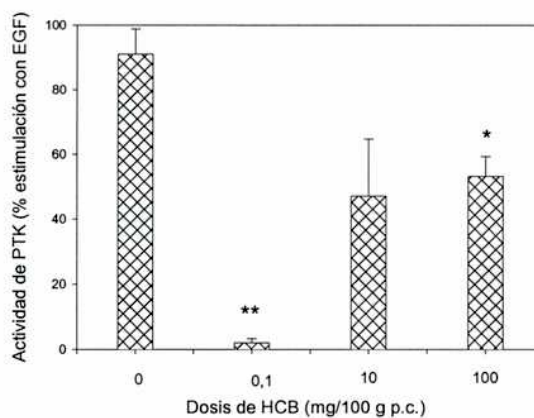
La actividad de PTKs ensayada en la fracción citosólica, estaba significativamente aumentada a 0.1 y 10 mg/100 g p.c. de HCB, (**Figura 18**).

Figura 17.

A

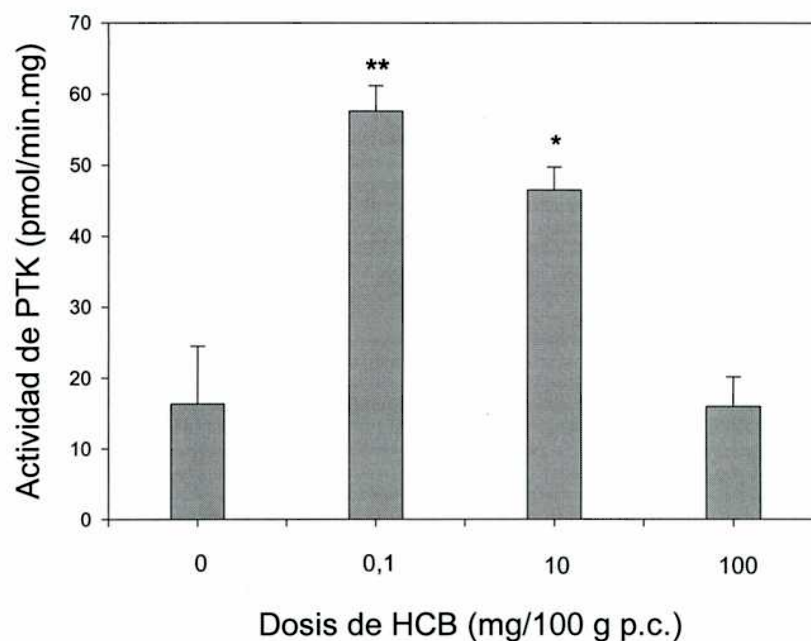


B



Cambios inducidos por la intoxicación con diversas dosis de HCB, durante 30 días, sobre la actividad de PTKs de membrana plasmática hepática. (A) Actividad de PTKs, en presencia o ausencia de EGF. Las dosis correspondientes de HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/100 g p.c.) fueron administradas diariamente por intubación gástrica, durante 30 días. La actividad de PTKs fue ensayada en ausencia (□) o presencia (▨) de EGF (100 ng/100 μ l). Las membranas plasmáticas fueron preincubadas durante 15 minutos con EGF (100 ng). (B) Porcentaje de la actividad de PTK estimulada con EGF, en membrana plasmática hepática, usando poli- Glu-Tir como sustrato, como se indica en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media $\pm$ ES, (N = 3). Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ son designados con * y los que tienen $P < 0,005$ son designados con **, basados en un test de ANOVA de un factor.

Figura 18.



Alteraciones de la actividad de PTKs citosólicas, en función de la dosis de administración de HCB, durante 30 días. Las dosis correspondientes de HCB (0, 0.1, 10 o 100) o vehículo, fueron administrados diariamente por intubación gástrica. La actividad de PTKs fue determinada usando como sustrato exógeno el poli -Glu-Tir, como se indica en Materiales y Métodos. Cada punto representa la media $\pm$ ES, (N = 3). Los valores significativamente diferentes de los controles, con $P < 0,05$ son designados con * y los valores con $P < 0,005$ son designados con **, basados en un test de ANOVA de un factor.

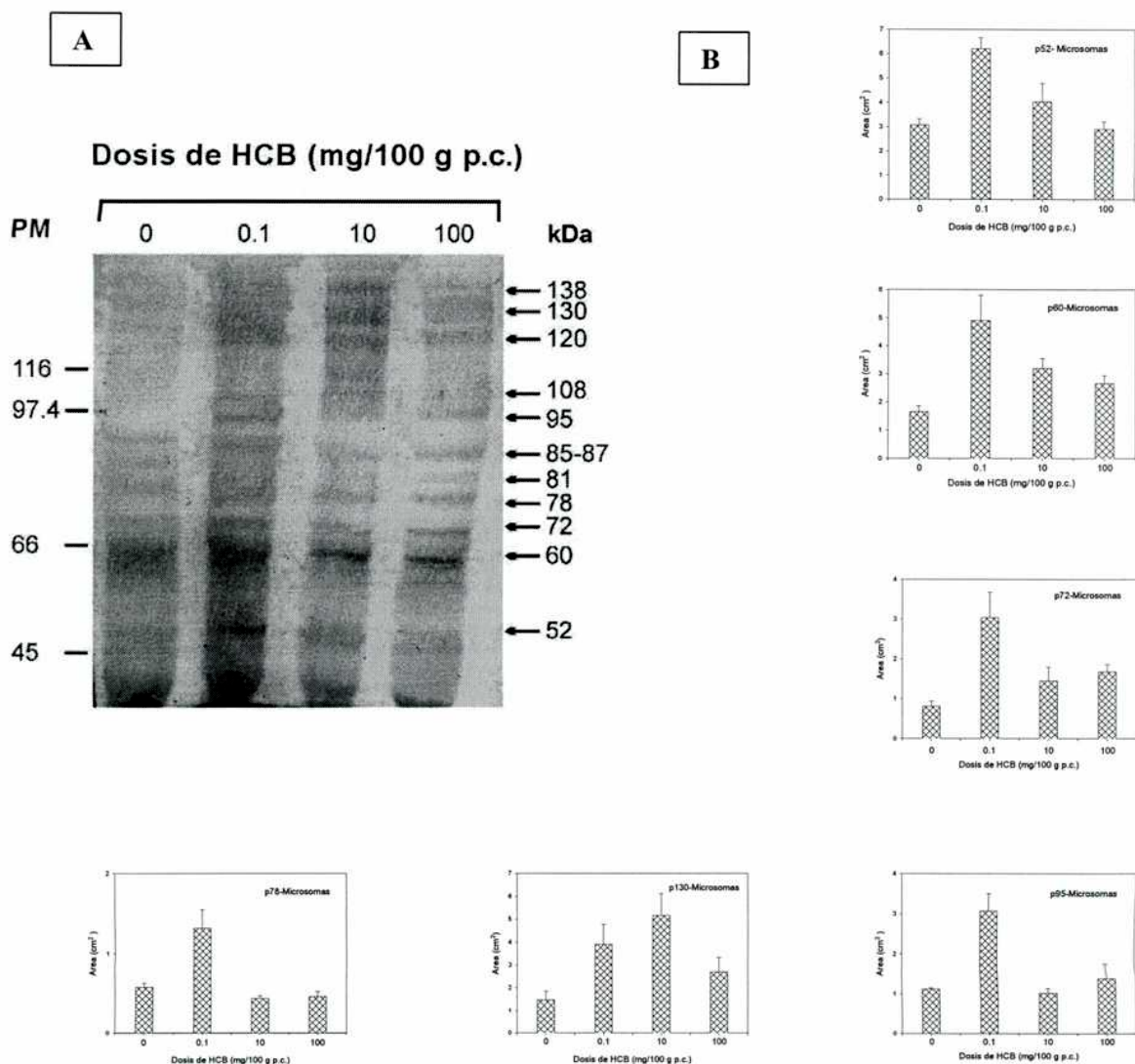
F- Contenido inmunodetectable de fosfotirosina en proteínas endógenas.

A los efectos de relacionar el contenido de REGF con la transducción de la señal, se midió el contenido de fosfotirosina de proteínas microsomales y citosólicas. Aunque los REGFs están unidos exclusivamente a la membrana plasmática, varios de sus sustratos asociados (GRB2 y SHC) son mayormente citosólicos.

En la **Figura 19** se muestra el inmunoblot del contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas microsomales hepáticas, provenientes de ratas intoxicadas con HCB (0.1, 10 y 100 mg/100 g p.c.). Se puede notar el incremento en los niveles de fosfotirosina de múltiples bandas en forma dosis dependiente, con un máximo a 10 mg de HCB para las bandas de 138 y 130 Kd. Algunas bandas (85-87, 78, 72, 60 y 52 Kd) muestran un efecto bifásico con un máximo de contenido de fosfotirosina a 0.1 mg/100 g p.c. de HCB.

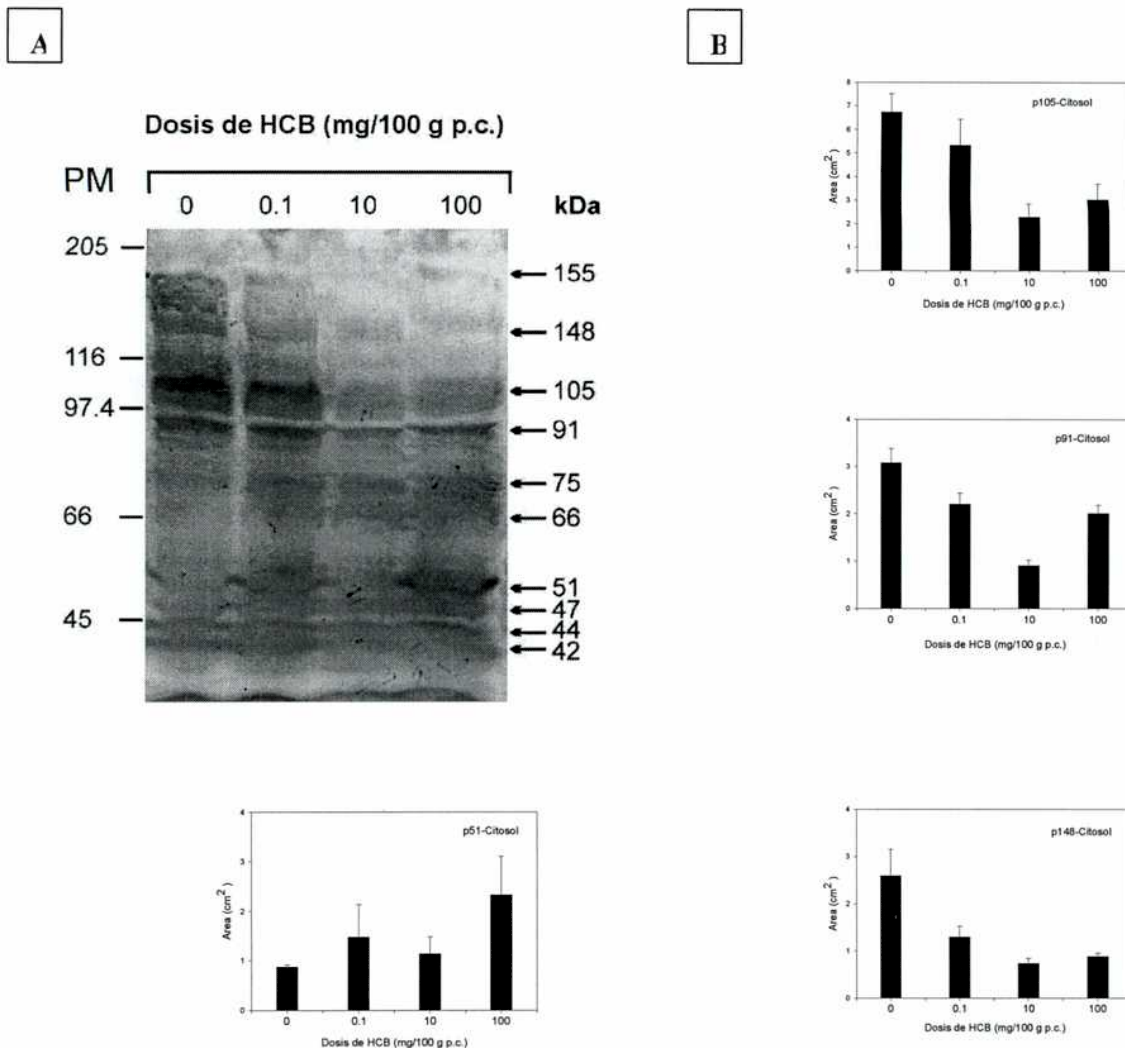
En la fracción citosólica, el contenido de fosfotirosina de cuatro proteínas (155, 148, 105-100 Kd y 91 Kd) disminuía de manera dependiente de la dosis. Por otro lado, el de las proteínas de 75 y 51 Kd aumentaban por el tratamiento con HCB 100 mg/100 g p.c. (**Figura 20**).

Figura 19.



Detección inmunoquímica del contenido de fosfotirosina en proteínas microsomales hepáticas de animales tratados *in vivo* con diferentes dosis de HCB. Las dosis correspondientes de HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/10 g p.c.) o vehículo, fueron administrados por intubación gástrica durante 30 días. (A) Inmunoblot de proteínas microsomales. Las proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 7,5 %, y el contenido de fosfotirosina fue detectado por inmunoblot con anticuerpo policlonal. El segundo anticuerpo usado, fue hecho en cabra, contra conejo, conjugado con fosfatasa alcalina. PM: proteínas marcadoras de peso molecular. (B) Análisis densitométrico de las proteínas más notables, y su representación en barras de los porcentajes de cambio con respecto al control. Los resultados reflejan la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes.

Figura 20.



Detección inmunoquímica del contenido de fosfotirosina en proteínas citosólicas hepáticas de animales tratados *in vivo* con diferentes dosis de HCB. Las dosis correspondientes de HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/10 g p.c.) o vehículo, fueron administrados por intubación gástrica durante 30 días. (A) Inmunoblot de proteínas citosólicas. Las proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 7,5 %, y el contenido de fosfotirosina fue detectado por inmunoblot con anticuerpo policlonal. El segundo anticuerpo usado, fue hecho en cabra, contra conejo, conjugado con fosfatasa alcalina. PM: proteínas marcadoras de peso molecular. (B) Análisis densitométrico de las proteínas más notables, y su representación en barras de los porcentajes de cambio con respecto al control. Los resultados reflejan la media $\pm$ ES de tres experimentos independientes.

G- Efecto del HCB sobre la actividad de Uroporfirinógeno Decarboxilasa.

Con el propósito de establecer una relación, entre los efectos observados del HCB sobre parámetros de la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento y el desarrollo de manifestaciones tóxicas, medimos la actividad de Uroporfirinógeno Decarboxilasa, en función de la dosis de HCB (0, 0,1, 10 y 100 mg/100 g p.c.) administrado durante 30 días.

Los resultados revelaron una disminución significativa (71 %) de la actividad de la UROD sólo con la dosis máxima del pesticida (**Figura 21**). Estas observaciones indican que la inducción de porfiria por HCB, un efecto de toxicidad manifiesta, se desencadena con dosis 1000 veces mayor que la necesaria para generar otros cambios bioquímicos, como la internalización de receptores de EGF, la actividad de PTKs y el contenido de fosfotirosina, que ocurren a partir de 0.1 mg/100 g p.c. de HCB.

En resumen.

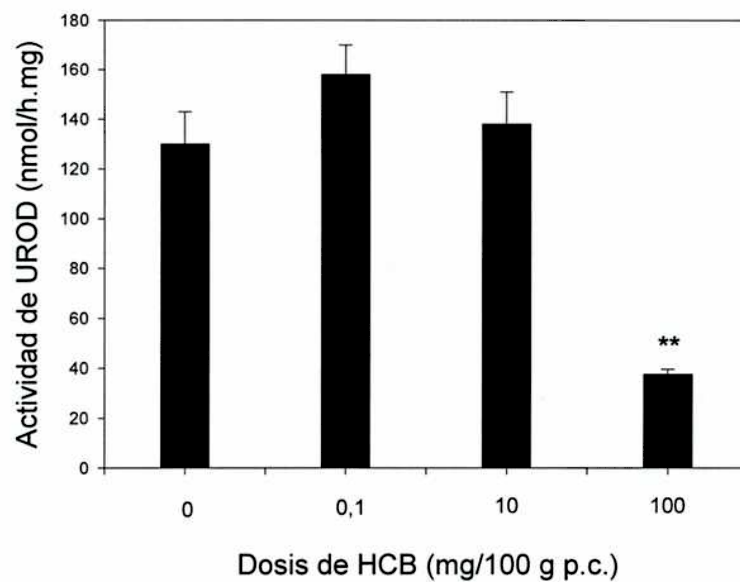
Hemos demostrado que la administración *in vivo* de HCB durante 30 días, alteró la fosforilación de proteínas endógenas de membrana microsomal y citosólicas hepáticas, de una manera dosis-dependiente, así como en la actividad de PTKs de las mismas fracciones, con notables incrementos a la dosis de 0.1 mg/100 g p.c. de HCB.

Los niveles disminuidos del EGFR observados en membrana plasmática de animales tratados, con HCB a 0.1 mg/100 g p.c., fueron paralelos al incremento de los mismos en membranas microsomales, indicando que el plaguicida produce una internalización de receptores.

Nuestros resultados sugieren por primera vez, que el tratamiento crónico con dosis bajas de HCB, modifica el camino de transducción de señales dependiente de fosfotirosina. Estos parámetros podrían ser indicadores

biológicos sensibles a la exposición de HCB en ausencia de lesiones toxicológicas.

Figura 21.



Cambios dependientes de la dosis de administración de HCB, sobre la actividad de UROD. Los animales fueron tratados diariamente con HCB (0, 0.1, 10 o 100 mg/100 g p.c.) o vehículo por intubación gástrica, durante 30 días. Cada punto representa la media $\pm$ ES, (N = 3). La actividad de UROD fue determinada en la fracción citosólica de homogenato de hígado, usando uroporfirinógeno III como sustrato, como se indica en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,005$ se designan con **, basado en un test de ANOVA de un factor.

CAPITULO III.

EL HEXACLOROBENCENO INDUCE UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE ORNITINA DECARBOXILASA Y DEL CONTENIDO DE POLIAMINAS LIBRES.

Dado que el HCB es un agente carcinógeno, y teniendo en cuenta que produce modificaciones tempranas en la actividad de diversas enzimas de membrana y en el contenido de REGFs, estudiamos su efecto sobre la actividad de ODC y el contenido de poliaminas, marcadores de proliferación celular.

Es de señalar que, en diferentes líneas celulares normales, se encontró que el EGF y el TGF- α (otro ligando del receptor de EGF) estimulan la biosíntesis de poliaminas, sugiriendo que éstas son importantes en los eventos tempranos inducidos por EGF (Blachowski y col., 1994). Asimismo, en células de carcinoma de mama A431, que sobreexpresan al EGFR, se observó que las poliaminas inhibían en forma indirecta y dependiente de la dosis, la actividad PTK del receptor (Faaland y col., 1995).

A- Efecto del HCB sobre las actividades de ODC y PTKs y los niveles de poliaminas libres.

A1- Estudios en función del tiempo.

- Ensayos de intoxicación diaria, a 1 y 10 días.

El tratamiento con HCB (100 mg/100 g p.c.) durante 1 día, indujo una significativa estimulación en la actividad de ODC hepática, mientras que a los 10 días no se evidenciaron diferencias. La actividad de PTKs de microsomas, en cambio, disminuyó en un 36% a 1 día, mientras que a los 10 días la reducción se acentuó hasta el 80% (**Figura 22**). En estudios anteriores de actividad de PTKs de membrana microsomal en función del tiempo (Página

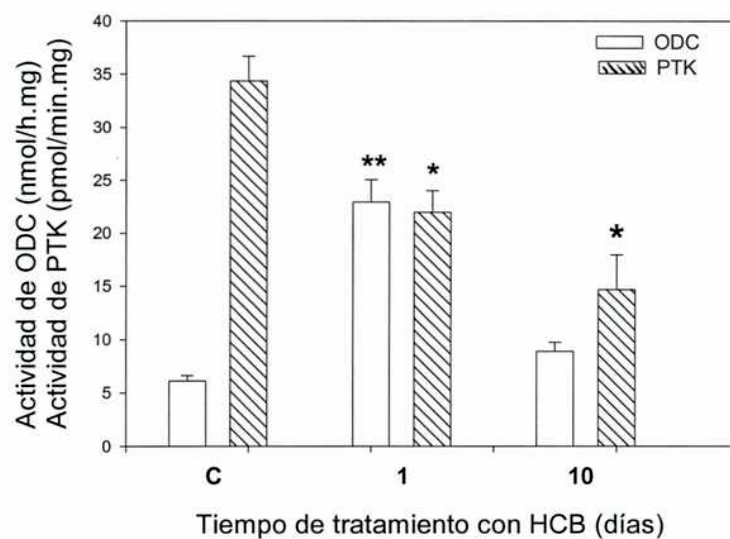
78, Figura 10), observamos un aumento del 100 % por efecto del HCB a los 2 días, lo que demuestra que este parámetro es un marcador muy evidente en tratamientos agudos, cuya actividad puede modificarse sensiblemente en períodos cortos de tratamiento.

Con el objetivo de ensayar la estabilidad de la enzima ODC hepática, se determinó su actividad en dos condiciones: en hígado fresco recién ablacionado y en hígado previamente guardado a - 20 °C, durante 24 horas. El resultado fue de una buena actividad específica para el hígado fresco, por lo que todas las determinaciones se realizaron en esas condiciones. La actividad ensayada en el órgano previamente freezeado fue muy baja comparada al hígado fresco.

La putrescina (put), primer poliamina en el camino de biosíntesis, presentó en algunos ensayos niveles no detectables. En mamíferos, la producción de espermidina y espermina es normalmente prominente, en cambio, el contenido de put, es bajo(Kashiwagi y col., 1986).

Los resultados del estudio del contenido de poliaminas, revelaron que los niveles de put y spd no se modificaron con respecto al control, mientras que la cantidad de spn aumentaba significativamente a 1 día de tratamiento (**Figura 23**). No se observaron niveles detectables de put a los 10 días de tratamiento.

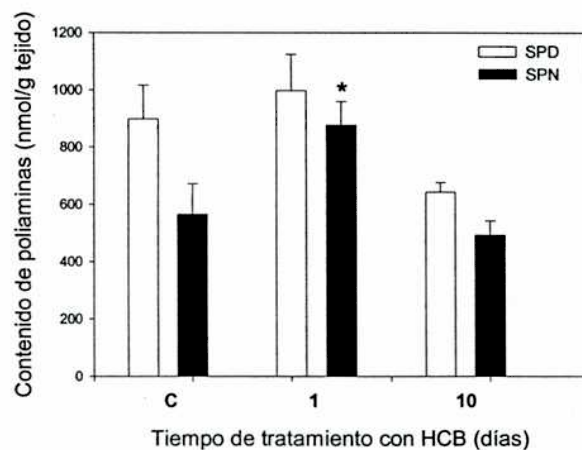
Figura 22.



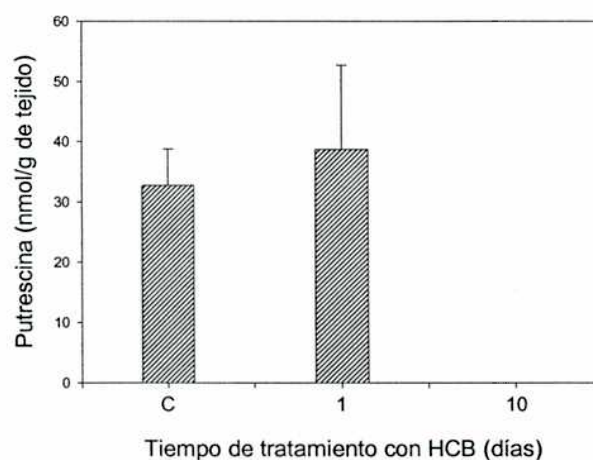
Alteraciones dependientes del tiempo de administración de HCB sobre las actividades de PTKs de membrana microsomal y de ODC hepáticas. Los animales fueron tratados diariamente con HCB (100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, durante 1 y 10 días. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). La actividad de PTKs fue determinada usando poli Glu-Tir como sustrato exógeno, mientras que la actividad de ODC se determinó usando [L- 1-¹⁴C]-ornitina, como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con *, mientras que aquellos valores con $P < 0,0005$ se designan con **, basado en un test de ANOVA de un factor.

Figura 23.

A



B



Modificaciones dependientes del tiempo de administración de HCB sobre el contenido de poliaminas libres hepáticas: A) espermidina (spd) y espermina (spn); B) putrescina (put). Los animales fueron tratados diariamente con HCB (100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, durante 1 y 10 días. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). Las poliaminas se determinaron a partir de la separación e identificación de derivados dansilados en T.L.C. como se indica en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con *, basado en un test de ANOVA de un factor.

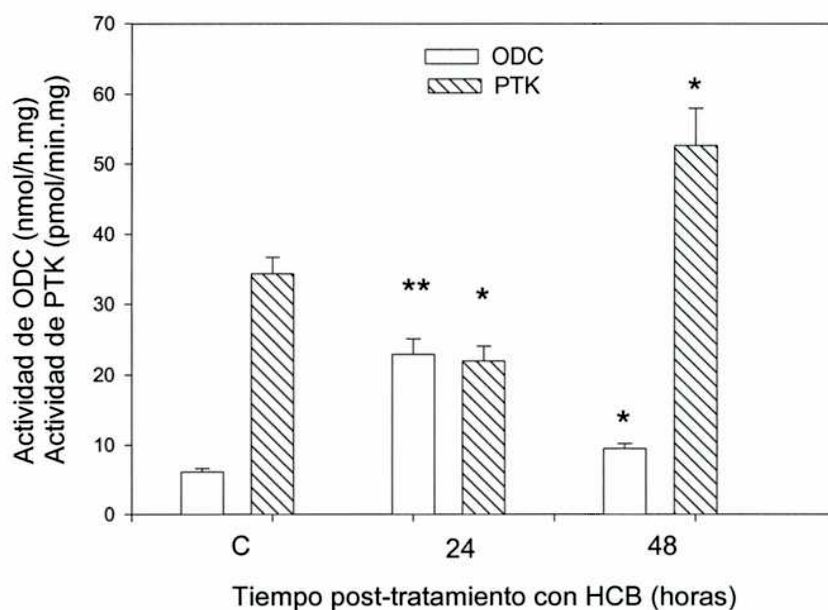
b) Ensayos a 24 y 48 horas, post-tratamiento de 1 sola dosis.

Dado que algunos investigadores miden el contenido de poliaminas entre las 12 y 24 horas después del pico máximo de actividad de ODC, diseñamos otro experimento, en el que 2 grupos de animales, recibieron una sola dosis de HCB (100 mg/100 g p.c.). El primer grupo, fue sacrificado a las 24 horas (1 día) y el segundo, a las 48 horas post- tratamiento (2 días).

La actividad de ODC estaba significativamente aumentada a las 24 y 48 horas post-tratamiento, con la mayor inducción encontrada a las 24 horas. La actividad de PTKs se redujo a las 24 horas, mientras que a las 48 horas post- intoxicación aumentó significativamente (**Figura 24**). Estos resultados de la actividad de PTKs a las 48 horas coinciden con las observadas anteriormente en tratamiento de 2 días consecutivos con el pesticida (Figura 10).

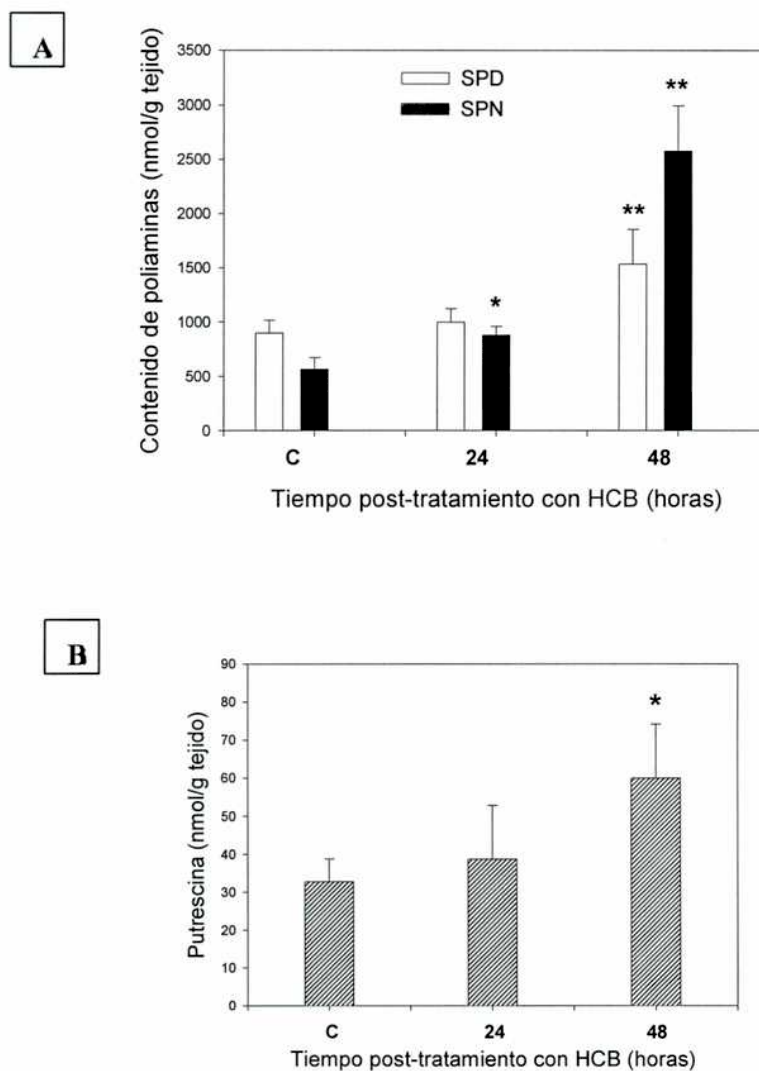
En cuanto al contenido de poliaminas, también se evidenciaron diferencias significativas entre las ratas tratadas y controles, siendo la spn la poliamina más sensible al tratamiento con el pesticida. Los niveles de spn incrementaron en forma significativa a las 24 horas y siguieron elevándose en un 90% a las 48 horas post-intoxicación, mientras que los niveles de spd sólo aumentaron significativamente a las 48 horas (**Figura 25**). En estos ensayos, los niveles de put fueron detectables, encontrándose diferencias sólo a las 48 horas post- tratamiento.

Figura 24.



Cambios agudos producidos por HCB, sobre las actividades de PTKs de membrana microsomal y de ODC hepáticas. Los animales fueron tratados con una única dosis de HCB (100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, y luego se los sacrificó a las 24 o 48 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES (N = 6). La actividad de PTKs fue determinada usando poli Glu-Tir como sustrato exógeno, mientras que la actividad de ODC se determinó usando [L-1- 14 C]-ornitina, como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con *, mientras que los valores con $P < 0,007$, se designan con ** y los valores con $P < 0,0005$ se designan con ***, basado en un test de ANOVA de un factor.

Figura 25.



Alteraciones agudas inducidas por HCB, sobre los niveles de poliaminas libres hepáticas: A) espermidina (spd) y espermina (spn); B) putrescina (put). Los animales fueron tratados con una única dosis de HCB (100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, y luego se los sacrificó a las 24 o 48 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). Las poliaminas se determinaron a partir de la separación e identificación de derivados dansilados en T.L.C. como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con * y los valores con $P < 0,0005$ se designan con **, basado en un test de ANOVA de un factor.

B) Estudios en función de la dosis.

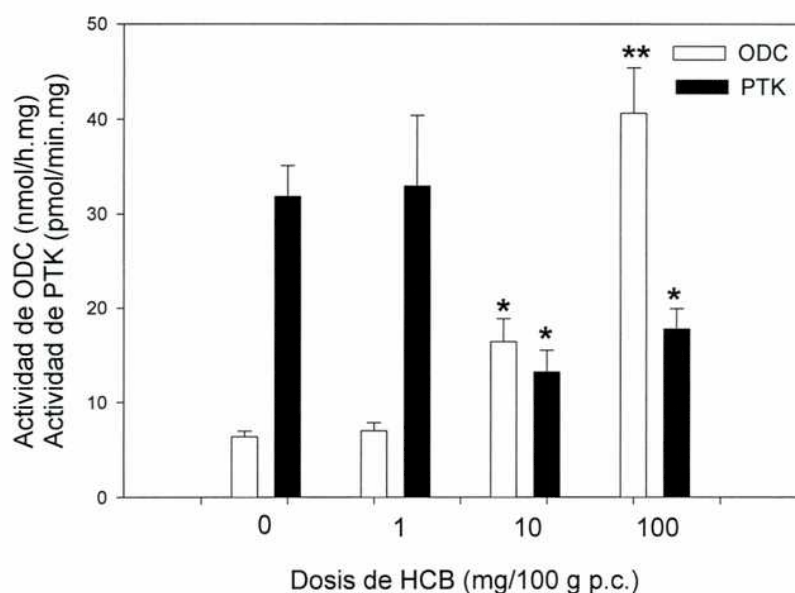
B1- La inducción de la actividad de ODC por el HCB es dependiente de la dosis.

Debido a que la estimulación producida por el tratamiento con HCB, sobre la actividad de ODC hepática, fue máxima a las 24 horas, realizamos una curva de dosis a ese tiempo. Los animales fueron tratados con el pesticida o el vehículo, en una única toma, con HCB(0, 1, 10 ó 100 mg/100 g p.c.) y se sacrificaron a las 24 horas.

La actividad de ODC fue aumentando en función de la dosis de HCB administrada, siendo este aumento significativo a 10 y muy significativo a 100 mg/100 g p.c. de HCB. En cambio, la actividad de PTKs de microsomas hepáticos, decreció notablemente a partir de los 10 mg/100 g p.c. del pesticida (**Figura 26**). Es interesante señalar, la respuesta inversa de ambas enzimas al tratamiento.

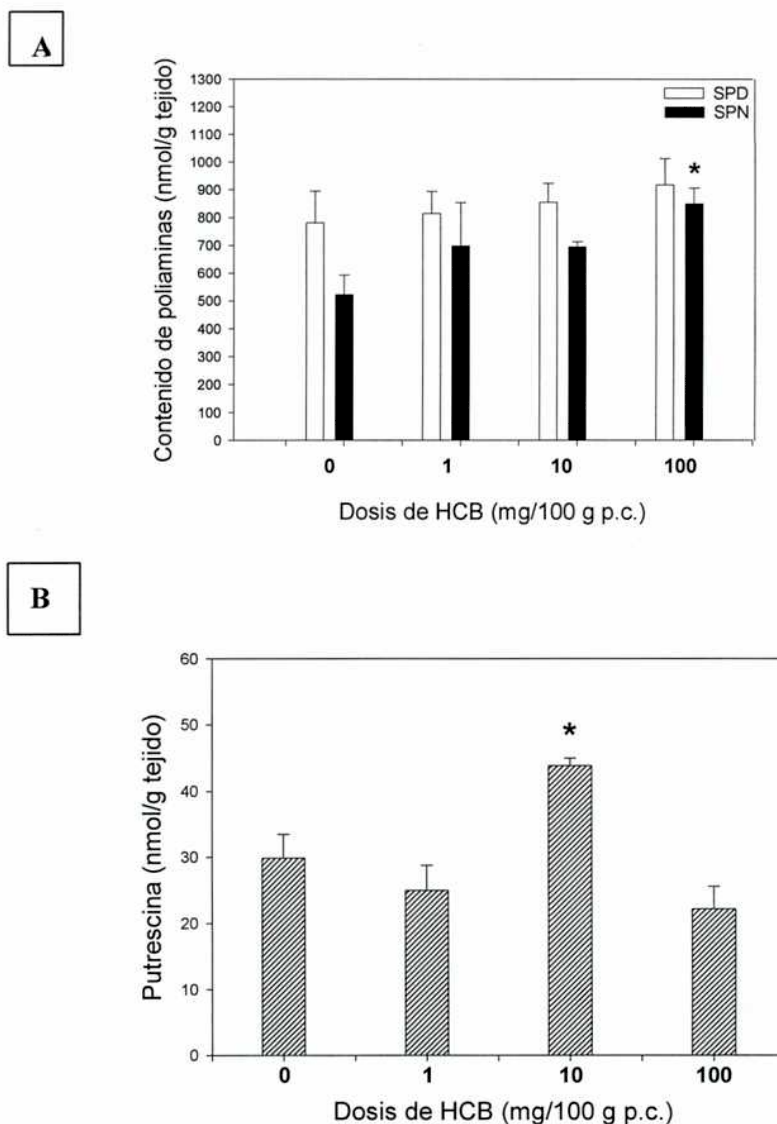
El contenido de spd no se modificó a ninguna de las dosis ensayadas del pesticida, mientras que los niveles de spn, en cambio, fueron incrementándose con la dosis, resultando significativos sólo a 100 mg/100 g p.c. de HCB (**Figura 27**). Nuevamente, encontramos niveles detectables de put, que aumentaron con HCB (10 mg/100 g p.c.).

Figura 26.



Alteraciones dependientes de la dosis de administración de HCB, a las 24 horas, sobre las actividades de PTKs de membrana microsomal y de ODC hepáticas. A los animales se les administró una única toma de HCB (0, 1, 10 o 100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, y luego se los sacrificó a las 24 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). La actividad de PTKs fue determinada usando poli Glu-Tir como sustrato exógeno, mientras que la actividad de ODC se determinó usando [L-1- 14 C]-ornitina, como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con *, mientras que los valores con $P < 0,005$ se designan con ** y los valores con $P < 0,0005$ se designan con ***, basado en un test de ANOVA de un factor.

Figura 27.



Cambios dependientes de la dosis de administración de HCB, a las 24 horas, sobre el contenido de poliaminas libres hepáticas: A) espermidina (spd) y espermina (spn); B) putrescina (put). A los animales se les administró una única toma de HCB (0, 1, 10 o 100 mg/100 g p.c.), o vehículo por intubación gástrica, y luego se los sacrificó a las 24 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). Las poliaminas se determinaron a partir de la separación e identificación de derivados dansilados en T.L.C. como se explica en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con *, basado en un test de ANOVA de un factor.

B2- La actividad de PKC se incrementa por el tratamiento con HCB.

Nos propusimos estudiar el efecto del HCB sobre la actividad de PKC debido a los resultados obtenidos anteriormente, en cuanto a: a- que el HCB indujo una fuerte disminución sobre la actividad de PTKs, a las 24 horas de tratamiento, y además, que la PKC ejerce un efecto inhibitorio sobre la PTK del receptor de EGF (Carpenter y Cohen, 1990); b- se conoce que la PKC podría jugar un rol en la estimulación del contenido de poliaminas.

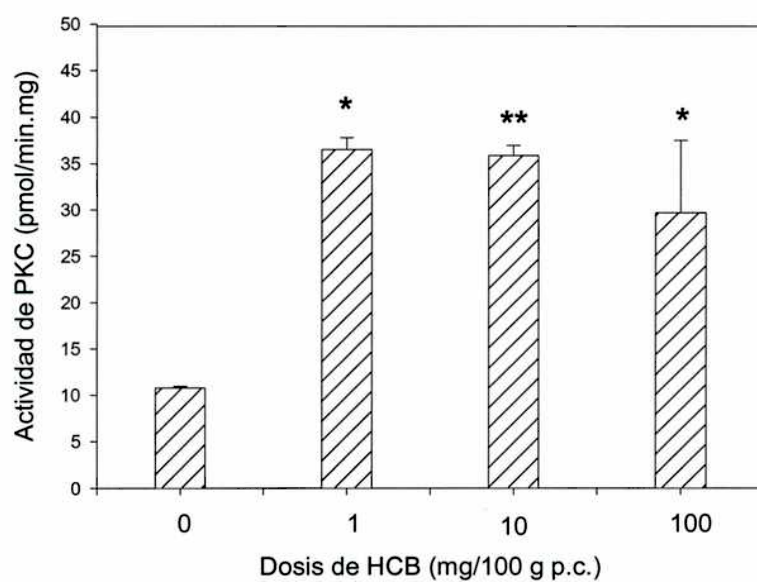
En la **Figura 28**, se muestra que el tratamiento con el tóxico durante 24 horas, induce un aumento muy significativo (250%) en la actividad de PKC a todas las dosis ensayadas.

C) Efecto del DFMO sobre la actividad de PTKs y su relación con la actividad de ODC y niveles hepáticos de poliaminas.

Para estudiar si en el efecto de la disminución de la PTK a las 24 horas, inducida por HCB, estaban involucradas las poliaminas, usamos un inhibidor suicida irreversible específico de la actividad de ODC como el DFMO, que puede ser administrado *in vivo* a los animales sin efectos adversos sobre otras vías metabólicas. Cuando la ODC es inactivada por DFMO, una cantidad estequiométrica de esta sustancia se une covalentemente a la enzima, reaccionando fundamentalmente con la cisteína 360 (Poulin y col., 1992).

El DFMO fue administrado en el agua de bebida a los animales, como una solución al 2 %, entre 24 y 30 horas antes y durante la administración del pesticida. El HCB (100 mg/100 g p.c.) se proporcionó en una sola toma y se sacrificaron los animales a las 24 horas post -tratamiento.

Figura 28.



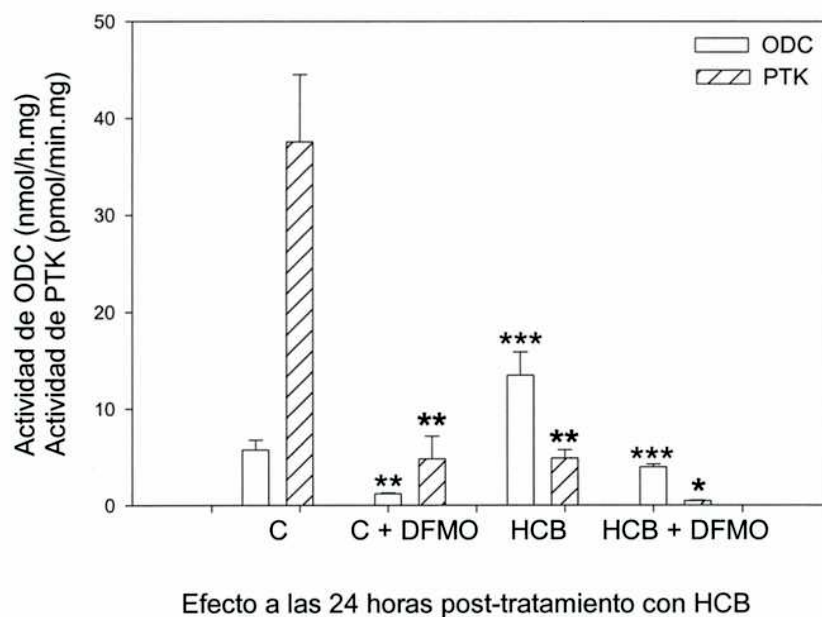
Efecto de la dosis administrada de HCB, a las 24 horas, sobre la actividad de PKC dependiente de calcio y fosfolípidos. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 3). La actividad de PKC fue determinada usando un péptido sintético, como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles con $P < 0,05$ se designan con (*), y los valores con $P < 0,006$ con (**), basado en un test de ANOVA de un factor.

Luego del tratamiento con DFMO, observamos que tanto la actividad de ODC, como la de PTKs, fueron significativamente inhibidas, tanto en los animales controles como en los tratados con el pesticida (**Figura 29**).

En cuanto a las poliaminas, el tratamiento con DFMO no produjo cambios en los niveles de spd, mientras que el contenido de spn disminuyó significativamente tanto en animales controles como tratados con HCB. El contenido de put no cambió en animales control, pero disminuyó en animales tratados con HCB por efecto del DFMO (**Figura 30**). Estos resultados podrían sugerir que los niveles basales de poliaminas son necesarios para la actividad normal de las PTKs y que el aumento en el contenido de poliaminas no estaría modulando negativamente la actividad de estas enzimas.

Es importante señalar, los niveles invariables de spd observados a las 24 horas, tanto en presencia de HCB como de DFMO. Por otro lado, cómo el contenido de spn sigue siendo el más sensible a la acción del tóxico y del DFMO y refleja claramente los cambios sufridos por la actividad de ODC.

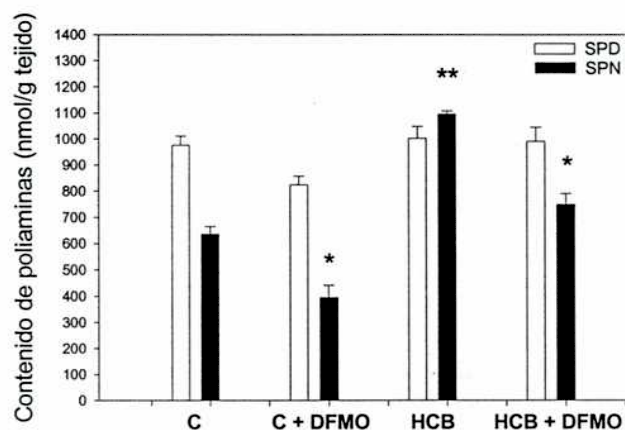
Figura 29.



Efecto del DFMO administrado *in vivo*, sobre las actividades de PTKs de membranas microsomales y ODC hepáticas, de animales control y tratados con HCB a las 24 horas. Los animales fueron provistos de DFMO al 2% en el agua de bebida y de una única toma de HCB (100 mg/100 g p.c.) y luego sacrificados a las 24 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). La actividad de PTKs fue determinada usando poli Glu-Tir como sustrato exógeno, mientras que la actividad de ODC se determinó usando [L-1- 14 C]-ornitina, como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles se designan: con *, $P < 0,05$ en control Vs. control + DFMO; con **, $P < 0,005$ y con ***, $P < 0,0005$ en control Vs. HCB y con •, $P < 0,05$, con ••, $P < 0,0005$ en HCB Vs. HCB + DFMO, basado en un test de ANOVA de un factor.

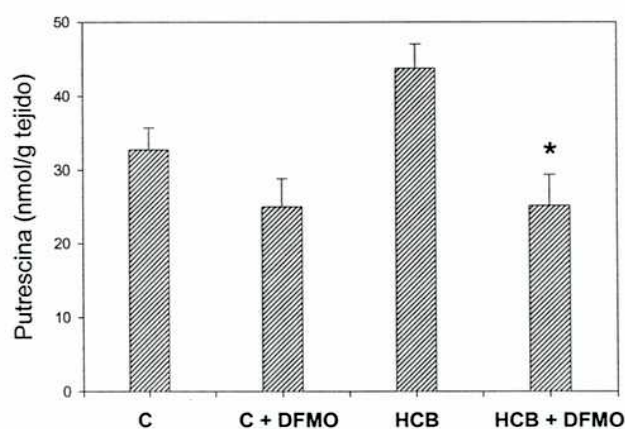
Figura 30.

A



Efecto a las 24 horas post-tratamiento con HCB

B



Efecto a las 24 horas post-tratamiento con HCB

Efecto del DFMO administrado *in vivo*, sobre el contenido de poliaminas libres hepáticas, de animales control y tratados con HCB a las 24 horas. A) espermidina (spd) y espermina (spn); B) putrescina (put). Los animales fueron provistos de DFMO al 2% en el agua de bebida y tratados con una única toma de HCB (100 mg/100 g p.c.) y posteriormente sacrificados a las 24 horas. Cada barra representa la media $\pm$ ES, (N = 6). Las poliaminas se determinaron a partir de la separación e identificación de derivados dansilados en T.L.C. como se explica en Materiales y Métodos. Los valores significativamente diferentes a los controles se designan: con *, para $P < 0,05$ en control Vs. control + DFMO; con **, para $P < 0,008$ y con • para $P < 0,05$ en control Vs. HCB y con ***, para $P < 0,05$ para HCB Vs. HCB + DFMO, basado en un test de ANOVA de un factor.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

1- El HCB afecta las funciones de membrana en forma dependiente del tiempo y de la dosis.

Considerando la importancia de las proteínas de membrana en el mantenimiento de las funciones celulares normales, examinamos los efectos del HCB sobre la actividad de dos enzimas de membrana hepática: ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente y 5'Nucleotidasa. Varios autores utilizan a estas enzimas como buenos marcadores de citotoxicidad inducida por químicos tipo dioxina (Matsumura y col., 1984; De Angelo y col., 1985; Birnbaum y col., 1990; Taylor y col., 1992).

Nuestros estudios mostraron alteraciones tiempo-dependientes en las actividades de ambas enzimas, siendo la ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente, más sensible al efecto del tóxico. Los ensayos en función de la dosis a 10 días de administración, mostraron que la actividad de la 5'Nucleotidasa disminuyó significativamente desde la dosis de HCB más baja empleada (Randi y col., 1998). Matsumura (1983) encontró que en ratas tratadas con TCDD, la actividad de las ATPasa Na⁺/K⁺ y ATPasa Mg⁺⁺ dependientes hepáticas, disminuyeron significativamente a los dos días de tratamiento, siendo el efecto dependiente de la dosis. Peterson y col., (1979) también encontraron una disminución de las actividades de estas enzimas en membrana plasmática hepática de ratas tratadas con TCDD, que se correlacionaba con una depresión de la excreción biliar de ouabaína.

2- El HCB aumenta el Índice hepatosomático.

Nuestros resultados mostraron que el aumento del índice hepatosomático (IH) en función de la dosis, era un parámetro poco sensible de intoxicación inducible por HCB.

El agrandamiento del hígado, se debe a la hiperplasia e hipertrofia de las células parenquimáticas, especialmente por una proliferación del retículo endoplasmático (Fowler y col., 1973). El HCB incrementa la actividad de varias

enzimas microsomales hepáticas asociadas al retículo endoplasmático liso como el citocromo P-448 y el citocromo P450 (Vizethum y Goerz , 1979) y las UDPGTs (Randi y col., 1999).

Nuestros resultados, están de acuerdo con los reportados por otros investigadores para sustancias tóxicas aromáticas polihalogenadas relacionadas (Cantoni y col., 1987; Den Besten y col., 1993).

3- Efecto del HCB sobre los niveles séricos de hormonas tiroideas y la actividad de UDPGTs para T₃ y T₄.

Los niveles séricos de tiroxina disminuían en forma dependiente de la dosis y del tiempo de administración de HCB, manifestándose este efecto desde tiempos muy tempranos de tratamiento (2 días). Por el contrario, los niveles séricos de triiodotironina no se encontraron alterados. Estudios realizados en ratas intoxicadas con TCDD y bifenilos policlorados, mostraron resultados similares, con disminución de las concentraciones de T₄ séricas, y un incremento en la excreción biliar total de T₄ y en la fracción excretada como glucurónido, mientras que las concentraciones plasmáticas y la excreción biliar de T₃ se mantuvieron sin cambios (Bastomsky, 1974; 1977).

Los sistemas enzimáticos involucrados en la conjugación de iodonitroninas están primariamente localizados en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos. La esterificación de hormonas tiroideas por conjugación con glucuronatos por el hígado facilita su excreción biliar y es un importante componente del metabolismo de las mismas (Curran y De Groot, 1991). Existen al menos 3 grupos de isoenzimas de UDPGTs responsables del metabolismo de hormonas tiroideas en rata, de las cuales, la llamada fenol-UDPGT es la que se induce con metilcolantreno, PCBs, dioxinas y HCB (Visser, 1996).

El HCB (100 mg/100 g p.c.) administrado durante 30 días, aumentó la glucuronidación de T₄ en un 100 %, sin producir cambios en la glucuronidación de T₃, sugiriendo que existen diferentes isoenzimas para las dos hormonas tiroideas en hígado de rata (Randi y col., 1999). Resultados similares

obtuvieron van Raaij y col (1993a) en ratas macho tratadas con HCB. Este aumento observado en la glucuronidación de tiroxina, está de acuerdo con lo reportado por otros autores en hígados de ratas intoxicadas con 3-metilclorantreno y clofibrato (Bastomsky y Papapetrou, 1973; Barter y Klaassen, 1992), TCDD (Henry y Gasiewicz, 1987) y bifenilos policlorados (Bastomsky y Murthy, 1976).

Sin embargo, pese a la pronunciada disminución en la T_4 sérica, el estatus tiroideo tisular hepático, evaluado por la actividad de enzimas hormono-tiroideo dependientes, como la Enzima málica (EM) y la Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) no es compatible con hipotiroidismo, como lo demostraron Kleiman de Pisarev y col., (1995). Debemos recordar que las alteraciones en las concentraciones séricas de las hormonas tiroideas no siempre reflejan la formación del complejo activo T_3 -receptor nuclear en los tejidos blanco. En un trabajo reciente, observamos que el HCB, incrementaba la transcripción del gen de la EM hepática, por un mecanismo que involucra al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) (Loaiza Pérez y col., 1999).

Se ha demostrado que el HCB, y su metabolito pentaclorofenol, modifican la unión de T_4 a sus proteínas transportadoras, por competir con el sitio de unión de la hormona (Van Raaij y col., 1991; Van den Berg, 1990). Sin embargo, en nuestro laboratorio no se encontraron alteraciones en la unión de T_4 a las proteínas transportadoras séricas (Kleiman de Pisarev y col., 1989), pudiendo atribuirse la diferencia en los resultados a que las técnicas empleadas podrían tener distinta sensibilidad.

Asimismo, las hormonas tiroideas poseen algunas acciones no genómicas, sobre todo asociadas a funciones de membrana como la entrada de glucosa, la actividad de Ca-ATPasa y las actividades de PKC y PKA (Davis y Davis, 1998). Estos efectos parecen estar mediados por T_4 o T_3 r más que por T_3 (Davis y col., 1983; Siegrist-Kaiser y col., 1990). Esto resulta interesante, ya que en nuestro modelo, el HCB disminuye el nivel de T_4 sérica, lo que podría influir sobre alguna de estas funciones.

4- HCB y contenido fosfolipídico.

Las alteraciones en el contenido fosfolipídico de las membranas, modifican la fluidez de las mismas, alterando la actividad de enzimas y receptores. Estos cambios, podrían involucrar modificaciones en la conformación o en la estructura cuaternaria que afecten el sitio activo de las enzimas, o cambios en la movilidad lateral de las proteínas o de sus sustratos (Spector y York, 1985). En nuestros estudios, hemos focalizado la atención sobre aquéllos fosfolípidos que intervienen en mecanismos de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) (Balogh y col., 1993; Gavrilova y col., 1995).

Nuestros resultados mostraron que el HCB producía una disminución significativa en el contenido de PI de membrana hepática, a los 2 días de tratamiento, sin grandes cambios en el contenido de PS y SPH, hasta los 8 días, aunque se observó una disminución no significativa a 1 y 2 días. Sin embargo, en el mismo período de tiempo, encontramos fuertes cambios en la actividad de PTKs y PKC de pendiente de calcio y fosfolípidos, y modificaciones en la fosfo-defosforilación de sustratos endógenos.

Otros autores encontraron una disminución en el contenido de SPH de membranas hepáticas con una semana de tratamiento con HCB (Billi de Catabi y col., 1997). La SPH podría jugar un rol estabilizante en las membranas, tanto en el mantenimiento de la estructura como en la regulación de la actividad de fosfolipasas (Van den Bosch, 1980). Merrill y col (1997) estudiaron la importancia del metabolismo de esfingolípidos en toxicología, proponiendo que actuarían como mediadores de caminos de transducción de señales que regulan la homeostasis del calcio celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis y que podrían estar implicados en varias enfermedades como el cáncer.

Pike y Eakes (1987) encontraron que el EGF estimula el recambio de PI en células que sobreexpresan receptores para el mismo y también en

hepatocitos, lo que resulta en la producción de IP_3 y DAG, estimulando de esta manera la actividad de PKC. Por otro lado, Fisher y col., (1991) observaron también, que el EGF y el PDGF estimulan la producción de DAG por hidrólisis de PC más que de PI. Si bien, nuestros resultados mostraron una disminución en la unión del EGF a sus receptores y una internalización de los mismos a 10 y 30 días de intoxicación respectivamente, sería atractiva la hipótesis de que el efecto primario del HCB a tiempos más cortos sobre el EGFR fuera el mecanismo inicial que desencadenaría el aumento en el recambio del PI, afectando así la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento.

5- El HCB induce fuertes cambios en la fosfo-defosforilación de sustratos endógenos y en la actividad de PTKs.

Los cambios observados en la fosforilación de proteínas endógenas, sugieren que alteraciones en las proteínas kinasas y fosfatasas estarían involucradas en el efecto pleiotrópico del HCB. Es importante mencionar, que el nivel estable de fosfoproteínas refleja la relación de las velocidades de fosfo y defosforilación, como resultado de la acción del HCB sobre proteínas kinasas y fosfatasas celulares. Así, los cambios en el perfil de fosforilación de proteínas, en función del tiempo y de la dosis del tóxico, indicaron que hay modificaciones desde estadios muy tempranos (2 días) de administración con HCB (100 mg/100 g p.c.) y a dosis muy bajas (0.1 mg/ 100 g p.c.) en intoxicaciones crónicas, tanto en proteínas microsomales como citosólicas. Estos resultados son relevantes ya que es la primera demostración de que el HCB afecta parámetros bioquímicos de membrana desde tiempos muy cortos y a dosis 1000 veces menores que aquéllas que producen manifestaciones tóxicas.

5a- Estudios en función del tiempo.

Las bandas más notables en las que el pesticida indujo un aumento de la fosforilación a tiempos tempranos de intoxicación (2 y 5 días) son las de 108, 72, 60 y 50 Kd, siendo la más conspicua la de 60 Kd, que disminuye notablemente a los 10 días, concomitantemente con una disminución en la actividad de PTKs de microsomas, que estaba incrementada significativamente a 2 y 5 días de tratamiento.

Es interesante esta relación en el tiempo entre la actividad de PTKs y la fosforilación de la p60, debido a que ésta banda corresponde a la movilidad de la SRC, una proteína que tiene actividad de PTK y juega un importante rol en el mecanismo de acción de los tóxicos tipo dioxina (Matsumura, 1994). Aunque debe tenerse en cuenta, que en el ensayo de PTKs se usa un sustrato exógeno específico (poli Glu-Tir) para el cual las quinasas evaluadas podrían tener diferentes especificidades y Kms que para los sustratos endógenos hepáticos.

5b- Estudios en función de la dosis.

-Curva de dosis a 10 días de tratamiento. Los estudios en función de la dosis de HCB realizados a 10 días, mostraron importantes alteraciones en la fosforilación de proteínas endógenas hepáticas, especialmente en la banda de 60 Kd, cuya fosforilación se redujo notablemente desde la dosis menor de pesticida (10 mg/100 g p.c.) y la de 50 Kd, que aumentó a la dosis máxima. Sin embargo, es importante señalar que la fosforilación de esta banda así como la de 50 Kd no es coincidente en su intensidad en todos los experimentos (Randi y col., 1998). Nuevamente, encontramos una relación entre la notable disminución en la fosforilación de la p60 y la actividad de PTKs microsomales.

Matsumura (1994) propone que la actividad de quinasa de la p60 -SRC está involucrada en la transducción de señales de receptores de factores de

crecimiento y que podría jugar un rol en la señal del receptor Ah unido al tóxico.

Recientemente, demostramos en nuestro laboratorio, que el HCB administrado durante 10 días, disminuye la unión del EGF a su receptor de membrana hepática, modificando la afinidad de los receptores de alta afinidad (Randi y col., 1998).

Se ha demostrado que las quinasas de la familia SRC están reguladas por fosforilación y defosforilación, y que la fosforilación de la tirosina 416 es un sitio positivo que activa a la enzima y que es absolutamente requerido para las versiones de SRC activadas y transformadas (Kmieciak y Shalloway, 1987; Kmieciak y col., 1988). Asimismo, la defosforilación del sitio de tirosina 527 por una fosfatasa de tirosina localizada en membrana es la causa de la activación mitótica por SRC (Bagrodia y col., 1991). También se observaron fosforilaciones *in vivo* sobre la SRC por la PKA y la PKC (Cooper, 1990).

- **Curva de dosis a 30 días de tratamiento.** Hemos demostrado por primera vez, que dosis de HCB 1000 veces menores que las que desencadenan efectos tóxicos, alteran el equilibrio quinasas -fosfatasas.

Observamos que mientras la fosforilación de proteínas citosólicas disminuye con el aumento de la dosis de HCB administrada, la fosforilación de proteínas microsomales va en aumento. Este efecto podría deberse a que muchos de los sustratos que se fosforilan en tirosina, son proteínas citosólicas que una vez fosforiladas se translocan a la membrana, para ejercer su efecto. Por ejemplo, las SHCs, son proteínas que se fosforilan rápidamente en tirosina por el REGF y se reclutan desde el citosol, asociándose principalmente a membrana plasmática y endosomas (Di Guglielmo y col., 1994). Las SHCs que se fosforilan de manera dependiente de EGF, tienen pesos moleculares de 46, 55 y 66 Kd y en nuestro trabajo hemos observado que las proteínas que más se alteran en su fosfo-defosforilación por el tratamiento con el pesticida, tanto en estudios de dosis como de tiempo, tienen movilidades que corresponden al intervalo 60-45 Kd, específicamente, 45, 50 -52 y 60 Kd.

En cuanto a la relación entre la fosforilación *in vitro* de proteínas endógenas y la actividad de PTKs, encontramos que a 0.1 mg/100 g p.c. de HCB aumentaba la fosforilación de algunas proteínas microsomales, paralelamente al notable incremento en la actividad de PTKs de membrana plasmática.

5c- Efecto de la adición de inhibidores de fosfatasa sobre la fosforilación *in vitro*.

En presencia de inhibidores de fosfatasa, como Na_3VO_4 y NaF, encontramos una disminución general en la fosforilación de proteínas, en membranas microsomales, tanto en muestras provenientes de animales control como tratados. Esto se podría deber a que durante la preincubación de proteínas microsomales, algunos sustratos endógenos fueron fosforilados con ATP frío y luego no estuvieron sujetos a la acción de fosfatasa, por lo que disminuyeron los residuos disponibles para la fosforilación con ^{32}P -ATP.

En el caso de los animales intoxicados durante 10 y 30 días, el aumento en la fosforilación de proteínas microsomales, observado en presencia de ortovanadato de sodio sólo, se debe posiblemente a la activación de PTKs como sugirió Girault (1994). Si bien este inhibidor de fosfatasa, siempre indujo un incremento en la incorporación de ^{32}P en las proteínas microsomales, su efecto varió con el tiempo y la dosis de administración del tóxico, sugiriendo que la alteración de la actividad de fosfatasa podría estar involucrada en el mecanismo de acción del HCB.

Ueki y col, (1995) encontraron que el ortovanadato de sodio, bajo condiciones de una completa inhibición de la actividad de PTPs, aumenta la actividad de quinasa de tirosina del receptor de insulina. Por otro lado, Klarlund (1985) reportó que el vanadato puede inhibir la defosforilación de quinasas de tirosina celulares que a menudo son blanco de fosforilación en tirosina, como la pp60^{src} y el receptor de insulina, y de esta manera incrementar su actividad en forma indirecta. Sin embargo, Earp y col (1983)

propusieron que el vanadato también puede estimular la actividad de quinasas de tirosina directamente, como el caso del receptor de insulina (Tamura y col., 1984).

En el caso de las proteínas citosólicas, el ortovanadato modificó la fosforilación de proteínas en función de la dosis de HCB, sin modificaciones a la dosis máxima. Este comportamiento, podría deberse a que en este último caso el HCB estuviera disminuyendo la actividad de fosfatasa que defosforilan sustratos citosólicos, decreciendo así el número de residuos fosforilables.

Para una proteína regulada por fosforilación, las actividades de las quinasas y fosfatasa que actúan sobre un sitio particular, deberían estar aproximadamente balanceadas, de lo contrario, la proteína podría encontrarse desde totalmente fosforilada hasta totalmente defosforilada (Hunter, 1995). La actividad catalítica intrínseca de muchas quinasas y fosfatasa de serina (PSKs y PSPs) es aproximadamente la misma, así como las concentraciones de las principales PSKs y PSPs (Cohen, 1992). Contrariamente, la actividad intrínseca de fosfatasa de tirosina (PTPs) es generalmente 2 o 3 órdenes de magnitud mayor que las de las quinasas de tirosina (PTKs) (Sun y Tonks, 1994). Esta alta actividad de PTPs podría mantener bajo el nivel de fosfotirosina de las proteínas celulares y permitir el efecto transitorio de muchas respuestas de proteínas que se fosforilan en tirosina.

Podemos concluir, que el tratamiento con HCB rompe el balance entre quinasas y fosfatasa, como se observa en las alteraciones en la fosforilación de ciertos sustratos endógenos, que se mantienen en el tiempo y que podrían jugar un rol en el mecanismo de acción del tóxico. En cuanto a estos cambios, no sabemos si son fisiológicamente relevantes o si son el desencadenante de otros cambios bioquímicos significativos que tienen lugar como resultado de la acción del HCB. Podría ser que estas modificaciones fueran adaptativas o, por el contrario, que contribuyan a desarrollar posteriores efectos patológicos.

6- El HCB modifica el comportamiento de los receptores de EGF y el contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas.

En este estudio hemos demostrado por primera vez, que el HCB disminuye la unión del EGF a sus receptores de membrana, caracterizado por una reducción en la constante de afinidad (K_a) de los sitios de alta afinidad y en la concentración de los receptores de baja afinidad. Madhukar y col., (1984) también encontraron que la unión del EGF a sus receptores de membrana hepática disminuyó en ratas tratadas con TCDD, y mostraron gráficos de Scatchard bifásicos. Asimismo, otros autores observaron que en ratas tratadas con TCDD, disminuía la capacidad de unión del EGF a su receptor, como resultado de niveles disminuidos de proteína receptora tanto en microsomas como en membrana plasmática, debido a una reducida cantidad de ARNm (Sewall y col., 1994 y 1995).

Hemos demostrado por primera vez que la administración *in vivo* de HCB a ratas durante 30 días, produce una disminución del contenido de receptores de EGF en la membrana plasmática, siendo muy notable el efecto a la dosis más baja (0.1 mg/100 g p./c.), en la que se observó un aumento paralelo en los niveles de REGFs de la membrana microsomal, que por la técnica de fraccionamiento subcelular empleada representa los microsomas, los endosomas y el aparato de Golgi.

Estos resultados podrían deberse, a una internalización de los receptores, dado que: 1) existe una correlación entre el nivel inmunodetectable de los REGFs en microsomas y el aumento en el contenido de fosfotirosina de las p95, p72, p60, p52 y p45, a la misma dosis, que reflejarían la fosforilación de sustratos endógenos por la PTK del receptor, después de su internalización en los endosomas. 2) observamos una correlación entre los niveles de REGFs en membrana plasmática, y la disminución de la estimulación de PTKs de esa fracción subcelular, por el agregado de EGF *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con HCB durante 30 días, produce modificaciones en el contenido de fosfotirosina de numerosas proteínas microsomales y citosólicas, a todas las dosis ensayadas. Por otra parte, existen fuertes evidencias de que la fosforilación en tirosina de proteínas está implicada tanto en caminos de señales mitogénicas como en transformaciones oncogénicas (Wen-Chun Hung y col., 1993).

Asimismo, Bombick y Matsumura (1987a) encontraron que el TCDD aumenta los niveles inmunodetectables de pp60^{c-src} en hepatocitos de rata y cobayo, con un pico máximo a los 10 días de tratamiento. Recientemente se encontraron las SHC, proteínas blanco de quinasas de tirosina activadas, implicadas en la transmisión de la señal hacia Ras. Existen tres isoformas: la p46shc, la p52shc y la p66shc, que se fosforilan en tirosina por estimulación con EGF y forman complejos estables con Grb2 (Migliaccio y col., 1997). Bevan y col., (1996) encontraron que luego de la estimulación de hepatocitos con EGF, el nivel de fosforilación en tirosina de las SHCs se incrementó después de su incorporación a los endosomas en una manera paralela a lo que se observa para el REGF fosforilado. En nuestro trabajo, los sustratos fosforilados en tirosina por efecto del HCB, p52 y p43-45 coinciden con el peso molecular de estas proteínas y con el nivel de internalización del receptor.

Otra proteína conspicua, que cambia su contenido de fosfotirosina por el tratamiento con HCB es la p130, que aumenta en microsomas de ratas tratadas, con un pico en la dosis de HCB (10 mg/100 g p.c.). Sakai y col., (1994) encontraron que la p130 es el principal sustrato de la pp60^{v-src} y que se fosforila en tirosina en las células transformadas por v-Src y por v-Crk, formando complejos estables con estas oncoproteínas. Además, observaron que la p130 es una proteína citoplasmática que cuando se fosforila se transloca a la membrana y posiblemente al núcleo, sugiriendo un importante rol de la misma en la transducción de señales citoplasmáticas. Garton y col., (1996) encontraron que la p130 es el sustrato específico de la PTP^{-PEST}, una fosfatasa de tirosina citosólica ampliamente expresada en tejidos de mamíferos y está regulada negativamente por PKC y PKA. También el incremento del

contenido de fosfotirosina de la p130, fue observado en células transformadas por c-Ha-ras y por sobreexpresión de ornitina decarboxilasa (Hölttä y col, 1994).

Se ha propuesto que los hidrocarburos aromáticos polihalogenados podrían aumentar la síntesis de EGF o de otro péptido similar tal como el Factor de Crecimiento Transformante- α (TGF- α), que se uniría al receptor de EGF de membrana con una afinidad comparable al EGF, activando su PTK intrínseca (Pike y col., 1982; Massagué, 1983, Mead y Fausto, 1989).

No conocemos la causa de que el efecto sobre los REGFs se observe en forma más notable a la dosis menor del pesticida. Una posibilidad es que hubiera un mecanismo de acción para el HCB a bajas dosis, independiente del Ahr y otro mecanismo dependiente de dicho receptor a altas dosis, ya que Hahn y col., (1989) encontraron que el HCB es un agonista débil del Ahr. Por otra parte, el estado funcional de la membrana plasmática es diferente en función de la dosis de HCB administrada. A dosis altas, Billi de Catabi y col., (1997) encontraron grandes cambios en la fluidez de la membrana y nosotros demostramos una importante disminución de las actividades de ATPasa Na⁺/K⁺ dependiente y 5'Nucleotidasa.

Es importante enfatizar, que nuestros hallazgos sobre las alteraciones inducidas por el HCB sobre el REGF, son los primeros reportados en la literatura para este tóxico, y de fundamental importancia en la comprensión del mecanismo de acción del mismo. El HCB tiene un efecto pleiotrópico en la fisiología celular y algunos de estos efectos podrían asociarse a la activación de los REGFs, ya que se encontró que este receptor no sólo tiene funciones en el crecimiento y diferenciación, sino también en el metabolismo intermedio (Peak y Agius, 1994, Grau y col., 1996).

8- El HCB modifica la actividad de quinasas de tirosina (PTKs) hepáticas.

La administración de HCB durante 30 días, induce una notable estimulación de las PTKs de membrana plasmática a la menor dosis utilizada (0,1 mg/100 g p.c.).

Según Matsumura (1994) el mecanismo del TCDD y tóxicos relacionados sobre la internalización del receptor de EGF, está definitivamente mediado por el receptor Ah (Lin y col., 1991; Madhukar y col., 1988; Matsumura y col., 1985; Lucier, 1991); acompañándose de un aumento de la actividad de quinasas de tirosina (Bombick y Matsumura, 1987b), asociado a la activación dependiente de ligando del camino de transducción de señales de este receptor. De esta manera, muchos tipos celulares tratados con estos tóxicos, se comportan como si recibieran un estímulo de un factor de crecimiento y están en el proceso de activar la transducción de la señal.

Hemos demostrado que la estimulación de la actividad de PTKs de membrana plasmática por EGF (Figura 17) disminuía paralelamente con la cantidad de receptores encontrados en la misma, estableciendo un paralelismo entre los niveles de receptor y su función.

Sin embargo, es sorprendente que a la dosis de HCB que produce la mayor internalización de los REGFs, se observa una mayor actividad de PTKs de membrana plasmática, con respecto a los controles. Este resultado podría explicarse, ya sea por la estimulación de otros receptores de membrana con actividad de PTK, por efecto del HCB, tales como el receptor de insulina; o porque los receptores existentes en membrana plasmática y en endosomas tempranos, ya estarían unidos a su ligando con su PTK activada.

9- El HCB reduce la actividad de una enzima marcadora de porfiria.

La exposición a HCB y otros hidrocarburos aromáticos polihalogenados tales como TCDD y algunos bifenilos polihalogenados, causan uroporfiria hepática en humanos y animales experimentales (De Matteis, 1991, Mylchreest y Charbonneau, 1997).

Nuestros resultados mostraron que la actividad de UROD sólo fue significativamente inhibida a la dosis máxima de HCB empleada, sugiriendo que la activación del camino de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento y el desencadenamiento de la porfiria, serían mecanismos independientes. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se ha observado, que la disminución de los niveles séricos de tiroxina, es un parámetro más sensible en relación a la dosis de HCB que la porfiria, y éste mecanismo, podría tener un efecto protector sobre el desencadenamiento de dicha patología, como lo demostraron Sopena de Kracoff y col., (1995).

Se ha sugerido que la inhibición de la UROD podría estar mediada por una unión covalente de metabolitos reactivos de HCB al centro activo de la enzima, como la tetraclorobenzoquinona y la semiquinona radical (Van Ommen y col, 1986; Stewart y Smith, 1986).

La dependencia del receptor Ah, en ratones, ha sido considerada obligatoria, para la depresión en la actividad de UROD y la acumulación de porfirinas seguidas de la administración de HCB, mientras que en ratas es un punto variable (Franklin y col, 1997). Van Birgelen y col., (1996) sugieren que la potencia relativa de los PCBs para la acumulación de porfirinas hepáticas podría estar basada en una oxidación por el CYP1A2 de uroporfirinógeno III a uroporfirina III, mediada por el receptor Ah.

10- Efecto del HCB sobre la actividad de Ornitina Decarboxilasa hepática y el contenido de poliaminas libres.

10a- El tratamiento agudo con HCB induce la síntesis de poliaminas.

La ODC está altamente regulada en células de mamíferos, con el objetivo de proveer un nivel de poliaminas adecuado a la velocidad de crecimiento celular. La regulación de esta enzima ocurre por medio de cambios en la cantidad de proteína y estos cambios pueden ser a nivel de transcripción, traducción y postraduccionales por variaciones en la velocidad de degradación (Pegg y col., 1994).

Nuestros resultados mostraron por primera vez, que el HCB indujo la actividad de ODC hepática a 24 y 48 horas post-tratamiento, en forma dosis dependiente, con un aumento concomitante de espermina. Recordemos que la spn es el producto de la transformación metabólica de put en spd y de spd en spn. Los niveles de putrescina por lo general fueron bajos, y en algunos ensayos fueron detectables y en otros no

Los niveles de spd resultaron menos sensibles, aumentando sólo significativamente a las 48 horas post-tratamiento. Estos resultados podrían deberse a que a las 48 horas, en que los niveles de spn ya están incrementados, la velocidad de transformación de spd a spn disminuiría (Pegg, 1986), observándose entonces niveles significativamente elevados de put y spd. La actividad disminuida de la ODC a las 48 horas en relación a las 24 horas, podría deberse al efecto regulatorio negativo de la acumulación de poliaminas. También podrían estar involucrados los transportadores específicos de poliaminas, tanto en la entrada como en la salida desde los hepatocitos. Debemos tener en cuenta, que nosotros sólo medimos el contenido de poliaminas libres, pero no sabemos como se ajusta el contenido total que incluye las poliaminas unidas a diferentes macromoléculas.

No sabemos si el HCB afecta la regulación de la ODC a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional. Deberíamos realizar estudios de hepatocitos *in vitro* con HCB, inhibiendo la síntesis de proteínas y /o la síntesis de ARN, para encontrar el punto de regulación en el cual interviene el tóxico. Birnbaum (1992) propone que la inducción enzimática de ODC es uno de los efectos biológicos cruciales de la intoxicación con TCDD, y que este cambio parece estar mediado por el receptor Ah.

Se ha propuesto, que los cambios en la actividad de ODC *in vivo* en respuesta a la disminución o aumento de poliaminas no están acompañados por cambios en los niveles de ARNm de la enzima (Kahana y Nathans, 1985; McConlogue y col., 1986). Se encontraron dos clases de mecanismos de regulación post-transcripcionales para la ODC. El primero, es un control de la traducción del ARNm por poliaminas, donde parece que las poliaminas modularían la estructura secundaria del 5' UTR, deprimiendo la producción de ODC. El segundo, es que las poliaminas causarían una degradación post-traduccional de las subunidades enzimáticas antes de que se ensamble el dímero activo de la ODC (Davis y col., 1992). Según Pegg y col., (1994) la combinación del contenido de poliaminas y la cantidad de eIF-4E fosforilado (se une al 5'UTR del ARNm) en las células, es probablemente lo que regula la síntesis de ODC.

10b- El DFMO administrado *in vivo*, reduce la actividad de PTKs.

El DFMO, un inhibidor suicida irreversible específico de la ODC, produjo una reducción en la actividad de PTKs, tanto en animales controles como tratados con el tóxico. Esto indicaría que el aumento del contenido de spn, que se observó en los animales tratados con HCB, no sería la causa de la disminución de la actividad de PTKs.

La disminución de la actividad de PTKs en ratas controles, tratadas con DFMO, podría deberse a que la síntesis normal de poliaminas juega diferentes roles en la fisiología celular, pero uno de los más importantes se relaciona con la estabilización de membranas y la formación de los "hoyos revestidos" para la internalización de receptores unidos a ligando, en la transducción de señales extracelulares. Se ha propuesto que las poliaminas pueden modular el movimiento de proteínas receptoras de membrana, y otras proteínas incluyendo PKC, a través de su capacidad estabilizadora (McCormack y col., 1998).

10c) El HCB estimula la actividad de PKC.

La actividad de PKC dependiente de calcio y fosfolípidos, estaba aumentada a las 24 horas de tratamiento con HCB, a todas las dosis ensayadas, conjuntamente con una reducción de la actividad de PTKs. Dado que serían necesarios niveles fisiológicos de poliaminas para la actividad normal de las PTKs, la disminución observada a las 24 horas de tratamiento con HCB, no se debería al aumento de spn sino probablemente al incremento observado en la actividad de PKC.

Se ha reportado que la PKC produce una fosforilación en serina y treonina del receptor de EGF, disminuyendo la actividad de su PTK intrínseca (Carpenter, 1990). Como nuestros ensayos fueron realizados en microsomas y no sobre el receptor purificado, no podemos sacar conclusiones al respecto. Enan y Matsumura, (1995) observaron que el TCDD induce cambios en la actividad de la PKC y que éstos cambios están mediados por el receptor Ah.

Xue y col., (1996) encontraron que el tratamiento con acetato 13 - miristato-12 de forbol (PMA) activó a la PKC y produjo un aumento en la síntesis de ARNm y de enzima ODC, en keratinocitos humanos. Por otro lado, el EGF indujo la actividad de ODC, pero se observó que el agregado de PMA, inhibió la inducción de ODC producida por EGF, a través de la disminución en la unión del EGF a sus receptores, posiblemente mediado por una activación de

PKC. En nuestro estudio, encontramos respuestas similares en el tratamiento a las 24 horas con HCB, donde las actividades de PKC y ODC estaban aumentadas, mientras que disminuye la actividad de PTKs.

Por otro lado, Prystowsky y col., (1993) observaron que el EGF inducía la actividad de ODC por un aumento de la transcripción del gen y en la síntesis de la proteína en keratinocitos transformados por SV -40.

Según Cochet y Chambaz (1983), las poliaminas pueden expresar al menos en parte, su actividad biológica, a través de un efecto sobre sistemas de fosforilación de proteínas selectivos. Han sido caracterizadas dos tipos de proteínas quinasas sensibles a poliaminas: 1- la caseína kinasa II (CK2), ampliamente distribuída, representa una quinasa multifuncional y 2- la quinasa ODC nuclear dependiente de poliaminas, caracterizada en varios tejidos de mamíferos. Estos autores sugieren que a) estas quinasas podrían estar implicadas en la regulación de las actividades de ARN- polimerasa y b) en la regulación post-traducciona l de ODC, constituyendo una nueva clase de proteínas quinasas, que podrían definirse como sistemas de fosforilación mediados por poliaminas, donde éstas podrían funcionar como mensajeros intracelulares.

Una fosforilación en tirosina incrementada de la p130 se asoció recientemente en la transformación celular inducida por pp60^{v-src}, otras quinasas de tirosina de la familia src (Hölttä y col., 1993; Kanner y col., 1991), v-srk y ODC (Auvinen et al., 1992). Hölttä y col., (1994) demostraron que la p130, un sustrato de la pp60, es una de las proteínas con mayor contenido de fosfotirosina en células transformadas por ODC, sugiriendo que la fosforilación en tirosina juega un rol pivote en la transformación celular por ODC, ya que varios inhibidores de PTKs revierten la morfología celular al fenotipo normal. En nuestros experimentos a 30 días de intoxicación, encontramos que el contenido de fosfotirosina de la p130 estaba aumentado por el pesticida.

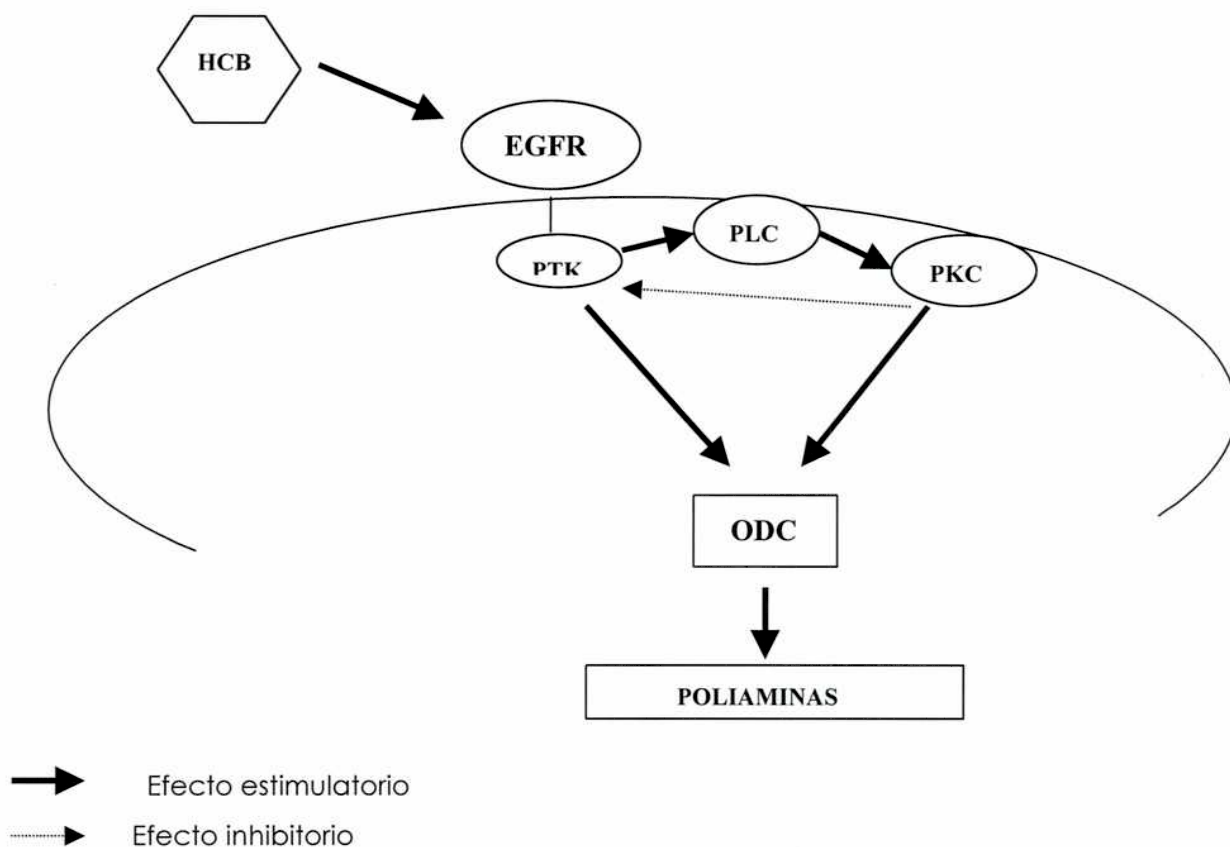
Cornwell y col (1986) encontraron que las poliaminas, tal como espermina, activan a la fosfatasa de serina/treonina PP2A *in vitro*. Esto podría

relacionarse con nuestros resultados sobre fosfo-defosforilación de proteínas, en los que la modificación de los residuos fosforilables en presencia de inhibidores de fosfatasas podría estar relacionado con el aumento del contenido de spn.

Aunque el efecto del HCB sobre el receptor de EGF se observó a los 10 días de tratamiento, y en intoxicaciones crónicas (30 días), es atractivo proponer el siguiente modelo de acción:

El HCB tendría un efecto estimulatorio sobre el receptor de EGF, activando su PTK intrínseca. Esta fosforilaría a la fosfolipasa C gamma (PLC γ), que degrada al fosfoinositol bifosfato (PIP₂) produciendo diacilglicerol (DAG) y inositol trifosfato (IP₃), estimulando la actividad de PKC. La activación de la PTK del EGFR podría ocurrir como un evento muy temprano, antes de las 24 horas post-tratamiento, ya que a este tiempo está significativamente inhibida, posiblemente por una regulación negativa vía PKC. Tanto la estimulación del receptor de EGF(antes de las 24 horas) como de la PKC (24 horas post-tratamiento) podrían estimular la actividad de ODC, con el consecuente aumento de poliaminas hepáticas. Para validar este modelo, deberíamos medir la actividad PTK intrínseca del EGFR, así como su contenido con un anticuerpo específico, y la actividad de PKC a tiempos más cortos de administración (6, 12 y 18 horas).

MODELO PROPUESTO:



Una diferencia clara entre el camino mediado por XRE y el camino de fosforilación de proteínas, es que el primero es apropiado para la activación directa de genes independientes que poseen XRE en sus promotores. En cambio, el camino de fosforilación de proteínas, ofrecería un medio conveniente para desencadenar los principales cambios celulares en programas que requieren una estrecha coordinación por diferentes reguladores celulares.

De nuestros experimentos no podemos decir si el efecto del HCB sobre los parámetros de transducción de señales de receptores de factores de

crecimiento, están mediados por la unión del tóxico al Ahr, dado que en uno u otro caso se alterarían los mismos componentes de la vía.

CONCLUSIONES

Finalmente deseo remarcar los aportes originales de este trabajo, al conocimiento del mecanismo de acción del HCB.

1- Alteración de la unión del EGF a su receptor de membrana e internalización de receptores, dependiente de la dosis de HCB.

2- Alteración de la fosfo-defosforilación de sustratos endógenos, actividades de PTK y PKC, desde dosis muy bajas de HCB (0.1 y 1 mg/100 g p.c.), y desde tiempos muy tempranos en los que aún no se encuentran manifestaciones tóxicas. Este análisis podría colaborar en la búsqueda de marcadores biológicos que puedan ser puestos a prueba en futuros trabajos en poblaciones expuestas.

3- Estimulación de la actividad de ODC y del contenido de poliaminas libres a tiempos cortos de tratamiento.



Dra Diana L Kleiman

BIBLIOGRAFIA

- Aaronson, S.A. (1991). *Growth factor and cancer*. Science **254**, 1146-1153.
- Ahlborg, U.G., Lindgren, J.E. y Mercier, M. (1974). *Metabolism of pentachlorophenol*. Arch. Toxicol. **32**, 271-281.
- Ahlborg, U.G., Larsson, K., y Thunberg, T. (1978). *Metabolism of pentachlorophenol in vivo and in vitro*. Arch. Toxicol. **40**, 45-53.
- Altomare, G., y Capella, G.L. (1995). *Occupational porphyria cutanea tarda due to exposure to symmetrical triazine herbicides*. Eur. J. Dermatol. **5**: 66-68.
- Alvarez, L., Randi, A., Alvarez, P., Kölliker Frers, R. y Kleiman de Pisarev, D.L. (1999a). *Effect of hexachlorobenzene on NADPH-generating lipogenic enzymes and L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue*. J. Endocrinol. Invest. **22**, (en prensa).
- Alvarez, L., Randi, A., Alvarez, P., Piroli, G., Chamson-Reig, A., Lux-Lantos, V. y Kleiman de Pisarev, D. (1999b). *Reproductive effects of hexachlorobenzene in female rats*. J. Appl. Toxicology (en prensa).
- Auruch, J., Zhang, X. y Kyriakis, J.M. (1994). *Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway*. Trends. Biochem. Sci. **19**, 279-283.
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C., y Hölttä (1992). *Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation*. Nature (London) **360**, 355-358.
- Bacchi, C.J., Nathan, H.C. y Hutner, S.H. (1980). *Polyamine Metabolism: a potential therapeutic target in Trypanosomes*. Science **210**, 332-334.
- Bagrodia, S., Chackalaparampil, I., Kmiecik, T.E. y Shalloway, D. (1991). Nature **349**, 172-175.

- Balogh, A., Kéri, G., Teplán, Y., y Csuka, O. (1993). *Epidermal growth factor increases ³²P incorporation into phosphatidylcholine y protein kinase C activity in colon carcinoma cell line (HT29).* Cell. Signalling **5**, 795 -802.
- Banan, A., Wang, J.Y., McCormack, S.A., y Johnson, L.R. (1996). *Relationship between polyamines, actin distribution, y gastric mucosal healing in rats.* Am. J. Physiol. **271** (Gastrointest. Liver Physiol. 34): C893- C903.
- Bandyopadhyay y col., (1998). *Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells.* J. Biol. Chem. **273**, 1568-1573.
- Barlett, G.R. (1959). *Phosphorus assay in column chromatography.* J. Biol. Chem. **234**, 466-468.
- Barter, R.A. y Klaassen, C.D. (1992). *UDP-glucuronosyltransferase inducers reduce thyroid hormone levels in rats by an extrathyroidal mechanism.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **113**, 36- 42.
- Baskurt, O.K., Levi, E., Temizer, A., Ozer, S., Caglayan, S., Dikmenoglu, N. y Andac, S.O. (1990). *In vitro effects of thyroxine on the mechanical properties of erythrocytes.* Life Sci. **46**, 1471 -1477.
- Bastomsky, C.H. y Papapetrou, P.D. (1973). *The effect of methylcholantrene on biliary thyroxine excretion in normal y Gunn rats.* J. Endocrinol. **5**, 267.
- Bastomsky, C.H. (1974). *Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (Aroclor 1254) y DDT on biliary thyroxine excretion in rats.* Endocrinology **95**, 1150-1155.
- Bastomsky, C.H. y Murthy, P.V.N. (1976). *Enhanced in vitro hepatic glucuronidation of thyroxine in rats following cutaneous application or ingestion of polychlorinated byphenyls.* Can. J. Physiol. Pharmacol. **54**, 23-26.

-Bastomsky, C.H., Murthy, P.V.N. y Banovac, K. (1976). *Alterations in thyroxine metabolism produced by cutaneous application of microscope immersion oil: Effects due to polychlorinated biphenyls*. Endocrinology **98**, 1309-1314.

-Bastomsky, C.H. (1977). *Enhanced thyroxine metabolism y high uptake goiters in rats after a single dose of 2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Endocrinology **101**, 292-296.

-Bentabol, A., Garrido, M.D. y Jodral, M. (1994). *Residual content of hexachlorobenzene in spanish cheeses*. Bul. Environ. Contam. Toxicol. **53** : 877-882.

-Billi de Catabbi, S., Sterin-Speziale, N., Fernández, M.C., Minutolo, C., Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L. (1997). *Time course of Hexachlorobenzene- induced alterations of lipid metabolism y their relation to porphyria*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. **29**, 335-344.

-Birnbaum, L., Mc Donald, M., Blair, P., Clark, A., y Harris, M. (1990). *Differential toxicity of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J mice oncogenic at the Ah locus*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **15**, 186-200.

-Birnbaum, L. S. (1994). *The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment*. Environ. Health Persp. **102**, 157- 167.

-Blachowski, S., Motyl, T., Grzelkowska, K., Kasterka, M., Orzechowski, A., y Interewicz, B. (1994). *Involvement of polyamines in epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF) -alfa y beta 1 action on culture of L6 y bovine myoblasts*. Int. J. Biochem. **26**, 891 -897.

-Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can. J. Biochem. Physiol. **37**, 911-919.

-Boarder, M.R. (1994). *A role for phospholipase D in control of mitogenesis*. Trends Pharmacol. Sci. **15**, 57-62.

- Boguski, M.S. y McCormick, F. (1993). *Nature* **366**, 643-654.
- Bombick, D.W., y Matsumura, F. (1987a). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes elevation of the levels of the protein tyrosine kinase 60^{src}*. *J. Biochem. Toxicol.* **2**, 141-154.
- Bombick, D.W., y Matsumura, F. (1987b). *TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin) causes an increase in protein tyrosine kinase activities at an early stage of poisoning in vivo in rat hepatocyte membranes*. *Life Sci.* **41**, 429-436.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding*. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braun, W.H., Young, J.D., Blau, G.E. y Gehring, P.J. (1977). *The pharmacokinetics and metabolism of pentachlorophenol in rats*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**, 395-406.
- Brucker-Davis, F. (1998). *Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function*. *Thyroid* **8**, 827-856.
- Cadena, D.L., Chan, C.L., y Gill, G.N. (1994). *The intracellular tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor undergoes a conformational change upon autophosphorylation*. *J. Biol. Chem.* **269**, 260-265.
- Canals, F. (1992). *Biochemistry* **31**, 4493-4501.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., y Soltoff, S. (1991). *Oncogenes and signal transduction*. *Cell* **64**, 281-302.
- Cantoni, L., Rizzardini, M., Tacconi, M.T. y Graziani, A. (1987). *Comparison of Hexachlorobenzene-induced alterations of microsomal membrane*

composition y monooxygenase activity in male y female rats. *Toxicology* **45**, 291-305.

-Carpenter, G. y Cohen, S. (1976). *¹²⁵I-labelled human epidermal growth factor*. *J. Cell Biol.* **71**, 159-171.

-Carpenter, G. y Cohen, S. (1990). *Epidermal growth factor*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7709-7712.

-Carraway, K.L. y Cerione, R.A. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 23860-23867.

-Carrier, F., Owens, R.A., Nebert, D.W. y Puga, A. (1992). *Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1856- 1863.

-Celano, P., Baylin, S.B., y Casero, R.A. Jr. (1989). *Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells*. *J. Biol. Chem.* **264**, 8922-8927.

-Che, M., Gatmaitan, Z. y Arias, I.M. (1997). *Ectonucleotidases, purine nucleoside transporter, and function of the bile canalicular plasma membrane of the hepatocyte*. *FASEB J.* **11**, 101- 108.

-Chen, W.S., Lazar, C.S., Lund, K.A. et al., (1989). *Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand - induced internalization and calcium regulation*. *Cell* **59**, 33-43.

-Cicirelli, M.F., Tonks, N.K., Diltz, C.D., Weil, J.E., Fisher, E.H. y Krebs, E.G. (1990). *Microinjection of a protein-tyrosine-phosphatase inhibits insulin action in Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5514-5518.

-Clemens, M.J., Trayner, I. y Menaya, J. (1992). *The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of the cell proliferation and differentiation*. *J. Cell Sci.* **103**, 881-887.

- Cochet, C. y Chambaz, E.M. (1983). *Polyamine-mediated protein phosphorylations: a possible target for intracellular polyamine action*. Mol. Cell Endocrinol. **30**, 247-266.
- Cohen, P. (1992). *Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates*. Trends Biochem. Sci. **17**, 408-413.
- Cohen, P. (1993). Biochem. Soc. Trans. **21**, 555-568.
- Comisión Administradora del Río de la Plata (1989). *Estudio para la evaluación de la Contaminación en el Río de la Plata*. Advanced Report. Argentine Hydrographic Navy Service, Buenos Aires.
- Conney, A.H., Miller, E.C. y Miller, J.A. (1956). *The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3 - methylcholantrene*. Cancer Res. **16**, 450-459.
- Conney, A.H., Jacobson, M., Schneidman, K., y Kuntzman, R. (1965). *Induction of liver microsomal cortisol 6 β -hydroxylase by dephenylhydantoin or phenobarbital: an explanation for the increased excretion of 6-hydroxycortisol in humans treated with these drugs*. Life Sci **4**: 1091.
- Conney, A.H. (1967). *Pharmacological implications of microsomal induction*. Pharmacol. Rev. **19**: 317.
- Cooper, J.A. (1990). En: *Peptides and Protein phosphorylation*, (De: B.E. Kemp), CRC Press. Florida, USA.
- Cornwell, T., Mehta, P., y Shenolikar, S. (1986). *Polyamine stimulation of protein phosphatase-2A from rat liver using a non- protein phosphoester substrate*. J. Cycl. Nucl. Prot. Phosph. Res. **11**, 373-382.

- Countaway, J.L., Nairn, A.C. y Davis, R.J. (1992). *Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase*. J. Biol. Chem. **267**, 1129-1140.
- Courtney, K.D. (1979). *Hexachlorobenzene (HCB): a review*. Environ. Res. **20**, 225.
- Crews, C.M. y Erikson, R.L. (1993). *Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all*. Cell **74**, 215-217.
- Cripps, D.J., Peters, H.A., Gocmen, A., y Dogramaci, Y. (1984). *Porphyria turcica due to hexachlorobenzene: A 20 to 30 year follow-up study on 204 patients*. Br J. Dermatol. **111**: 413-422.
- Curran, P. y De Groot, L.J. (1991). *The effect of hepatic enzyme- inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland*. Endocrine Reviews **12**, 135-150.
- Davis, F.B., Davis, P.J., y Blas, S.D. (1983). *Role of calmodulin in thyroid hormone stimulation in vitro of human erythrocyte Ca²⁺- ATPase activity*. J.Clin. Invest. **71**, 579-586.
- Davis, F.B., Moffett, M.J., Davis, P.J., Al Ogaily, M.S. y Blas, S.D. (1993). *Inositol phosphates modulate binding of thyroid hormone to human red cell membranes in vitro*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **77**, 1427-1430.
- Davis, R.H., Morris, D.R. y Coffino, P. (1992). *Sequestered end products and enzyme regulation: the case of Ornithine Decarboxylase*. Microbiol. Reviews **56**, 280-290.
- Davis, P.J. y Davis, F.B. (1998). *Nongenomic actions of Thyroid hormone*. En: Diseases of the Thyroid, edited by L.E. Braverman Humana Press Inc., Totowa, NJ, 17-34 pp.

-De Angelo, A.B., Garrett, C.T., Qeral, A.E. y Irwin, D. (1985). *Phosphorylation of specific rat plasma membrane proteins during promotion of γ -Glutamyl Transpeptidase-positive hepatic foci y inhibition by Di(2-ethyl-hexyl) phthalate.* Cancer Res. **45**, 2654-2660.

-Debets, F., Hamers, W., y Strik, J. (1980). *Metabolism as a prerequisite for the porphyrinogenic action of polyhalogenated aromatics, with special reference to hexachlorobenzene y polybrominated biphenyls (Firemaster BP -6).* Int. J. Biochem. **12**, 1019-1025.

-De la Riva, C. y Anadón, A. (1991). *Organochlorine pesticides in cow's milk from agricultural region in Northwestern Spain .* Bull. Environ. Contam. Toxicol. **46**: 527-533.

-De Matteis, F. (1991). *Drug-induced abnormalities of liver heme biosynthesis.* In Hepatotoxicology (R.G. Meeks, S.D. Harrison, y R.J. Bull Eds.), pp. 437- 479. CRC Press, Boca Raton, FL.

-den Besten, C., Vet, J.J., Besselink, H.T., Kiel, G.S., van Berkel, B.J., Beems, R., van Bladeren, P.J. (1991). *The liver, kidney and thyroid toxicity of chlorinated benzenes.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **111**, 69-81.

-den Besten, C., Bennik, M.H., Bruggeman, Y., Schielen, P., Kuper, F., Brouwer, A., Koeman, J.H., Vos, J.G. y Van Bladeren, P.J. (1993). *The role of oxidative metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria y thyroid hormone homeostasis: A comparison with pentachlorobenzene in a 13-week feeding study.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **119**, 181-194.

-Denison, M.S., Fisher, J.M. y Whitlock, J.P. Jr. (1988). *The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex.* J. Biol. Chem. **263**, 17221-17224.

-Di Guglielmo, G.M., Baass, P.C., Wei-Jia Ou, Posner, B.I. y Bergeron, J.J.M. (1994). *Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and*

hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. EMBO J. **13**, 4269-4277.

-Dogheim, S.M., Almaz, M.M. Kostyi, S.N., y Hegazy, M.E. (1988). *Pesticide residue in milk y fish samples collected from upper Egypt.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71**, 872-874.

-Dutton, G.J. y Burchell, B. (1977). *Newer aspects of glucuronidation.* Prog. Drug. Metab. **2**, 1.

-Earp, H.S., Rubin, R.A., Austin, K.S., y Dy, R.C. (1983). *Vanadate stimulates tyrosine phosphorylation of two proteins in Raji human lymphoblastoid cell membranes.* FEBS Lett. **161**, 180-184.

-Eckert, R., Randall, D. y Augustine, G. (1989). *Propagación y transmisión de señales.* En : Fisiología Animal, Mecanismos y adaptaciones, Cap 6, 136 -176. McGraw-Hill- Interamericana de España, Madrid.

-Elder, G.H. (1998). *Porphyria cutanea tarda.* Seminars in liver disease, **18**, 67-75.

-Enan, E. y Matsumura, F. (1995). *Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions.* Biochem. Pharmacol. **49**, 249-261.

-EPA US (1984). *Analytical Reference Standards y Supplemental data: the Pesticides y Industrial Chemical Repository.* EPA 600/4-84-082. U.S. Environmental Protection Agency, Las Vegas.

-Exton, J.H. (1990). *Signalling through phosphatidylcholine breakdown.* J. Biol. Chem. **265**, 1-4.

-Exton, J.H. (1994). *Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction.* Biochim. Biophys. Acta **1212**, 26-42.

- Faaland, C.A., Laskin, J.D., y Thomas, T.J. (1995). *inhibition of epidermal growth factor-stimulated EGF receptor tyrosine kinase activity in A431 human epidermoid carcinoma cells by polyamines*. *Cell Growth Differ.* **121**, 115-121.
- FAO (1986). *Código Internacional de Conducta para la Distribución y utilización de Plaguicidas*. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 31 pp.
- Fisher, J.M., Jones, K.W. y Whitlock, J.P. Jr. (1989). *Activation of transcription as a general mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin action*. *Mol. Carcinog.* **1**, 216-221.
- Fisher, G.J., Henderson, P.A., Voorhees, J.J. y Baldassare, J.J. (1991). *Epidermal growth factor-induced hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D and phospholipase C in human dermal fibroblasts*. *J. Cell. Physiol.* **146**, 309-317.
- Fowler, B.A., Lucier, G.W., Brown, H.W., y McDaniel, O.S. (1973). *Ultrastructural changes in rat liver cells following a single oral dose of TCDD*. *Environ. Health Perspect.* **5**, 141-148.
- Francis, J.E., y Smith, A.G. (1987). *Polycyclic aromatic hydrocarbons cause hepatic porphyria in iron-loaded C57 BL/10 mice: comparison of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition with induction of alkoxyphenoxazone dealkylations*. *Biochem. Biophys. Res. Common.* **146**, 13-20.
- Frank, R., Braun, H.E., Sirons, G.H., Rasper, J., y Ward, G.G. (1985). *Organochlorine y organophosphorous insecticides y industrial pollutants in the milk supplies of Ontario - 1983*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **48**, 499-504.
- Franklin, M.R., Phillips, J.D. y Kushner, J.P. (1997). *Cytochrome P450 induction, Uroporphyrinogen Decarboxylase depression, Porphyrin accumulation y*

excretion, y gender influence in a 3-week rat model of Porphyria Cutanea Tarda. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**, 289-299.

-Garrido, M.D. (1990). *Niveles de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en leches esterilizadas españolas. Estudio experimental del efecto de la temperatura sobre estos compuestos.* Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary. University of Córdoba.

-Garton, A.J., Flint, A.J., y Tonks, N.K. (1996). *Identification of p130^{cas} as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP- PEST.* *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6408-6418.

-Gavrilova, N.J., Setchenska, M.S. y Petkova, D.H. (1995). *Alteration in liver plasma membrane phospholipids y protein kinase activities during the development of chick embryo.* *Comp. Biochem. Physiol.*, **111 B**, 463- 469.

-Gill, N.G. (1989). In *Oncogenes y the Molecular Origins of Cancer* (De.: R.A. Weinberg), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 67 -96.

-Gilmour, S. K. , Aglow, E., y O'Brien, T.G. (1986). *Heterogeneity of ornithine decarboxylase expression in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treated mouse skin and in epidermal tumors.* *Carcinogenesis* **7**, 943-947.

-Gilwer, T.M. y Erikson, R.L. (1981). *Rous sarcoma virus transforming protein, p60src, expressed in E. coli, functions as a protein kinase.* *Nature* **294**, 771 -773.

-Girault, J.A. (1994). *Protein kinases and phosphatases.* *Neurotransmissions* **X 3**, 1-6.

-Goodnight, J.A., Mischack, H. y Mushinski, J.F. (1994). *Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation.* *Adv. Cancer Res.* **64**, 159-209.

- Gotoh, N., Tojo, A., Muroya, K. et al., (1994). *Epidermal growth factor receptor mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of SHC protein and SHC-GRB2/ASH association and retains mitogenic activity.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 167-171.
- Grau M., Tebar, F., Ramírez, I. y Soley, M. (1996). *Epidermal growth factor administration decreases liver glycogen and causes mild hyperglycaemia.* Biochem. J. **315**, 289-293.
- Green, A. y Newsholme, EA (1979). *Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of the rat to insulin and effects of some metabolites.* Biochem.J. **180**, 365-370.
- Hahn, M.E., Goldstein, J.A., Linko, P., y Gasiewicz, T. (1989). *Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8 -tetrachlorodibenzo -p-dioxin in vitro and in vivo.* Arch. Biochem. Biophys. **270**, 344-355.
- Haigler, H.T., McKanna, J.A. y Cohen, S. (1979). *Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431.* J. Cell Biol. **81**, 382-395.
- Hallberg, B., Rayter, S.I. y Downward (1994). *Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation.* J. Biol. Chem. **269**, 3913-3916.
- Harris, D.R., Green, W.L. y Craelius, W. (1991). *Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes.* Biochim. Biophys. Acta **1095**, 175-181.
- Hayashi, S. y Murakami, Y. (1995). *Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase.* Biochem. J. **306**, 1-10.
- Hayashi, S., Murakami, Y. y Matsufuji, S. (1996). *Ornithine decarboxylase antizyme: A novel type of regulatory protein.* Trends Biochem. Sci. **21**, 27-30.

- Heby, O. y Persson, L. (1990). *Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells*. Trends Biochem. Sci. **15**, 153-158.
- Henry, E.C. y Gasiewicz, T.A. (1987). *Changes in thyroid hormones y thyroxine glucuronidation in hamsters compared with rats following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **89**, 165-174.
- Higaki, I., Matsui-Yuasa, I., Terakura, M., Kinoshita, H. y Otani, S. (1993). *Increase in ornithine decarboxylase activity caused by hepatocyte growth factor in primary cultured adult rat hepatocytes*. Hepatology **17**, 99-102.
- Holt, S.J., Alexander, P., Inman, C.B. y Davies, D.E. (1995). *Ligand-induced translocation of epidermal growth factor receptor to the nucleus of NR6/HER fibroblasts is serum dependent*. Exp. Cell Res. **217**, 554 - 558.
- Hölttä, E., Sistonen, L., y Alitalo, K. (1988). *The mechanisms of ornithine decarboxylase deregulation in c-Ha-ras-oncogene-transformed NIH 3T3 cells*. J. Biol. Chem. **263**, 4500-4507.
- Hölttä, E., Auvinen, M., y Yerson, L.C. (1993). *Polyamines are essential for cell transformation by pp60^{v-src}: Delineation of molecular events relevant for the transformed phenotype*. J. Cell Biol. **122**, 903-914.
- Hölttä, E., Auvinen, M., Paasinen, A., Kangas, A. y Anderson, L.C. (1994). *Ornithine decarboxylase-induced cellular transformation: the involvement of protein tyrosine kinase(s) and pp130*. Polyamines in Clinical and Basic Science. En: Biochem. Soc. Trans. **22**, 853-859.
- Hordijk, P.L., Verlaan, Y., Jalink, K., van Corven, E.J. y Moolenaar (1994). *cAMP abrogates the p21 ras-mitogen-activated protein kinase pathway in fibroblasts*. J. Biol. Chem. **269**, 3534-3538.
- Hubbard, A.L., Wall, D.A. y Ma, A. (1983). *Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. I. Presence of the three major domains*. J. Cell. Biol. **96**, 217-229.

- Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1993). *On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation.* Trends Biochem. Science **18**, 172-177.
- Hudson, L.G., Toscano, W.A. y Greenle, W.F. (1986). *Regulation of epidermal growth factor binding in a human keratinocyte cell line by 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p- dioxin.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **77**, 251- 259.
- Hunter,T. (1987). *A thousand and one protein kinases.* Cell **50**, 823-829.
- Hunter, T. (1995). *Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signalling.* Cell **80**, 225-236.
- IARC (International Agency for Research of Cancer) (1978). *IARC monograph programme on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans.* IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. **18**, 15-35.
- Inagaki, N., Ho, M., Nakano, T., e Inagagi, M. (1994). Trends Biochem. Sci. **19**, 448-452.
- Jankun, J., Matsumura, F., Kaneko, H., Trosko, J.E., Pellicer, A. y Greenberg, A.H. (1989). *Plasmid-aided insertion of MMTV-LTR ans ras DNAs to NIH 3T3 fibroblast cells makes them responsive to 2,3,7,8-TCDD causing overexpression of p21^{ras} and down-regulation of EGF-receptor.* Mol. Toxicol. **2**, 177-186.
- Jänne, J., Alhonen, L. y Leinonen, P. (1991). *Polyamines: from molecular biology to clinical applications.* Ann. Med. **23**, 241-259.
- Johnson, R. M. y Garrison, J.C. (1987). *Epidermal growth factor and angiotensin II stimulate formation of inositol 1,4,5- and inositol 1,3,4-triphosphate in hepatocytes. Differential inhibition by pertussis toxin and phorbol 12-myristate 13-acetate.* J. Biol. Chem. **262**, 17285- 17293.

- Jones, K.G. y Sweeney, G.D. (1980). *Dependence of the porphyrinogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin upon inheritance of aryl hydrocarbon hydroxylase responsiveness*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**, 42-49.
- Kahana, C., y Nathans, D. (1985). *Translational regulation of mammalian ornithine decarboxylase by polyamines*. *J. Biol. Chem.* **260**, 15390-15393.
- Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Wang, H.C.R., Vines, R.R. y Parsons, J.T. (1991). *The SH2 y SH3 domains of pp60^{src} direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 y p110*. *EMBO J.* **10**, 1689-1698.
- Kärenlampi, S.O., Eisen, H.J., Hankinson, O. y Nebert, D.W. (1983). *Effects of cytochrome P₁-450 inducers on the cell-surface receptors for epidermal growth factor, phorbol 12,13-dibutyrate, or insulin of cultured mouse hepatoma cells*. *J. Biol. Chem.* **258**, 10378- 10383.
- Karin, M. (1994). *Current Biology* **6**, 415-424.
- Kashiwagi, K., Kobayashi, H. e Igarashi, K. (1986). *Apparently unidirectional polyamine transport by proton motive force in polyamine -deficient Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**, 972-977.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaatari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolly, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., y Tilson, H.A. (1996). *Research needs for the risk assessment of health y environmental effect of endocrine disruptors: A report of the USEPA-sponsored workshop*. *Environ. Health. Perspect.* **104**, 715-740.
- Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1991). *Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases*. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 67-76.
- Kennedy, S.W. y Wigfield, D.C. (1990). *Dose-response relationships in hexachlorobenzene-induced porphyria*. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1381-1388.

- Kishimoto, T., Taga, T., y Akira, S. (1994). *Cytokine signal transduction*. Cell **76**, 253-262.
- Klarlund, J.K. (1985). *Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins*. Cell **41**, 707-717.
- Kleiman de Pisarev, D.L., Sancovich, H.A. y Ferramola de Sancovich, A.M. (1989). *Enhanced thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-intoxicated rats*. J. Endocrinol. Invest. **12**, 767-772.
- Kleiman de Pisarev, D.L., Ríos de Molina, M.C. y San Martín de Viale, L.C. (1990). *Thyroid function y thyroxine metabolism in hexachlorobenzene- induced porphyria*. Biochem. Pharmacol. **39**, 817-825.
- Kleiman de Pisarev, D.L., Ferramola de Sancovich, A.M. y Sancovich, H.A. (1995). *Hepatic indices of thyroid status in rats treated with hexachlorobenzene*. J. Endocrinol. Invest. **18**, 271 -276.
- Kmiecik, T.E. y Shalloway, D. (1987). Cell **49**, 65-73.
- Kmiecik, T.E., Johnson, P.J. y Shalloway, D. (1988). Mol. Cell. Biol. **8**, 4541-4546.
- Kószó, F., Horvath, L.I., Simon, N., Siklosi, Cs. y Kiss, M. (1982). *The role of possible membrane damage in porphyria cutanea tarda: a spin label study of rat liver cell membranes*. Biochem. Pharmacol. **31**, 11.
- Krebs, E.G. (1972). Curr. Top. Cell. Regul. **5**, 99- 133.
- Kuppuswamy, D., Dalton, M. y Pike, L.J. (1993). *Serine 1002 is a site of in vivo and in vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor*. J.Biol.Chem. **268**, 19134-19142.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄*. Nature (London) **227**, 680-685.

- Lambrecht, R.W., Sinclair, P.R., Gorman, N., y Sinclair, J.F. (1992). *Uroporphyrinogen oxidation catalyzed by reconstituted cytochrome P4501A2*. Arch. Biochem. Biophys. **254**, 504-510.
- Lawrence, W.D., Schoenl, M. y Davis, P.J. (1989). *Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity*. J.Biol. Chem. **264**, 4766-4768.
- Li, X. y Coffino, P. (1992). *Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine -inducible protein antizyme*. Mol. Cell Biol. **12**, 3556-3562.
- Li, X. y Coffino, P. (1993). *Degradation of ornithine decarboxylase: Exposure of the C-terminal target by polyamine -inducible inhibitory protein*. Mol. Cell Biol. **13**, 2377-2383.
- Lim, C.K., Famei Li y Peters, P.J. (1988). *High-performance liquid chromatography of porphyrins*. J. Chromatography **429**, 123-153.
- Lin, F.H., Clarck, G., Birnbaum, L.S., Lucier, G.W., y Goldstein, J.A. (1991). *Influence of the Ah locus on the effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic epidermal growth factor receptor*. Mol. Pharmacol. **39**, 307-313.
- Lin, H.Y., Thacore, H.R., Davis, F.B. y Davis, P.J. (1996). *Thyroid hormone analogues potentiate the antiviral action of interferon - gamma by two mechanisms*. J. Cell Physiol. **167**, 269-276.
- Lowy, D.R. y Willumsen (1993). Annu. Rev. Biochem. **62**, 851-891.
- Loaiza-Pérez, A.I., Sancovich, H.A., Kleiman de Pisarev, D.L., Randi, A.S., Seisdedos, M., Ferramola de Sancovich, A.M. y Santisteban, P. (1998). *Acción de las hormonas tiroideas sobre la modulación de la expresión genética de la*

Enzima Málica citosólica hepática, en ratas intoxicadas con hexaclorobenceno. APPTLA **48**, 125-136.

-Loaiza-Pérez, A.I., Seisdedos, M.T., Kleiman de Pisarev, D. L., Sancovich, H.A., Ryi, A.S., Ferramola de Sancovich, A.M. y Santisteban, P. (1999). *Hexachlorobenzene, a dioxin-type compound, increases Malic Enzyme gene transcription through a mechanism involving the thyroid hormone response element*. Endocrinology, septiembre (en prensa).

-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. y Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

-Lu, L., Stanley, B.A., y Pegg, A.E. (1991). Biochem. J. **277**, 671-675.

-Lucier, G. (1991). *Mechanisms of dioxin tumor promotion: Implication for risk assessment*. Dioxin'91. 11th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds, Abstract S61, p60. School of Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, NC.

-Ma, X., Mufti, N.A. y Babish, J.G. (1992). *Protein tyrosine phosphorylation as an indicator of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in vivo and in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **189**, 59-65.

-Ma, X. y Babish, J.G. (1993). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases tyrosine phosphorylation of murine hepatic p34 (cdc2) kinase in vivo y in vitro*. Toxicologist **13**, 1112.

-Madhukar, B.V., Brewster, D.W., y Matsumura, F. (1984). *Effects of in vivo administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor binding of EGF in hepatic membrane of rat, guinea pig, mouse and hamster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7407-7411.

-Madhukar, B.V., Ebner, K., Matsumura, F., Bombick, D.W., Brewster, D.W., y Kawamoto, T. (1988). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an increase in*

protein kinases associated with epidermal growth factor receptor in the hepatic plasma membrane. J. Biochem. Toxicol. **3**, 261-277.

-Maitre, M.I., De la Sierra, P., Lenardon, A., Enrique, S. y Marino, F. (1994). *Pesticide residue levels in Argentinian pasteurised milk. Sci Total Environ.* **155**, 105-108.

-Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, m., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. y Schlessinger, J. (1989). *EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. Cell* **57**, 1101-107.

-Marks, Friedrich (1996). *The brain of the cell. En: Protein phosphorylation. F. Marks (eds.), VCH Weinheim (Federal Republic of Germany); VCH Publishers, Inc., New York, NY (USA), 1-35 pp.*

-Marks, F. y Gschwendt, M. (1996). *Protein kinase C. En: Protein phosphorylation. F. Marks (eds.), VCH Weinheim (Federal Republic of Germany); VCH Publishers, Inc., New York, NY (USA), 1-35 pp.*

-Marshall, J.S. y Tompkins, L.S. (1986). *Effect of o,p-DDD y similar compounds on thyroxine binding globulin. J. Clin. Endocrinol. Metab.* **28**, 386.

-Marton, L.J. y Morris, D.R. (1987). *Molecular and cellular functions of the polyamines, p. 79-105. En: P.P. McCann, A.E. Pegg, and A. Sjoerdsma (ed.), Inhibition of polyamine biosynthesis: biological significance and basis for new therapies. Academic Pressw, Inc., New York.*

-Massagué, J. (1983). *Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. J. Biol. Chem.* **258**, 13614 -13620.

- Matsumura, F. (1983). *Biochemical aspects of action mechanisms of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) y related chemicals in animals.* Pharmacol. Ther. **19**, 195-209.
- Matsumura, F., Brewster, D.W., Madhukar, B.V. y Bombick, D.W. (1984). *Alteration of rat hepatic plasma membrane functions by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).* Arch. Environ. Contam. Toxicol. **13**, 509-515.
- Matsumura, F., Madhukar, B.V., Bombick, D.W. y Brewster, D.W. (1985). *Toxicological significance of pleiotropic changes of plasma membrane functions, particularly that of EGF receptor caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* En: Biological Mechanisms of Dioxin Action (Eds. Poland A., and Kimbrough, R.D.), Banbury Report 18, pp. 267-287. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Matsumura, F. (1994). *How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals ?* Biochem. Pharmacol. **48**, 215-224.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L. y Baltimore, D. (1993). *A putative modular domain present in diverse signalling proteins.* Cell **73**, 629- 630.
- McConlogue, L., Dana, S. y Coffino, P. (1986). *Multiple mechanisms are responsible for altered expression of ornithine decarboxylase in overproducing variant cells.* Mol. Cell. Biol. **6**, 2865 -2871.
- McConnell, E.E. y Moore, J.A. (1979). *Toxicopathology characteristics of the halogenated aromatics .* Ann. NY Acad. Sci. **320**, 138-150.
- McCormack, S.A., Viar, M.J. y Johnson, L.R. (1993). *Polyamines are necessary for cell migration by a small intestinal crypt cell line.* Am. J. Physiol. **264** (Gastrointest. Liver Physiol. 27), G367-G374.

- McCormack, S.A., Wang, J.Y., Viar, M.J., Tague, L., Davies, P.J.A., y Johnson (1994). *Polyamines influence transglutaminase activity y cell migration in two cell lines*. Am. J. Physiol. **267** (Cell Physiol. 36); C706-C714.

- McCormack, S.A., Blanner, P.M., Zimmerman, B.J., Ray, R., Poppleton, H.M., Patel, T.B. y Johnson, L.R. (1998). *Polyamine deficiency alters EGF receptor distribution and signaling effectiveness in IEC- 6 cells*. Am. J. Physiol. **274**, (Cell Physiol. 43), C192-C205.

- Mead, J.E. y Fausto, N. (1989). *Transforming growth factor- α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 1558-1562.

- Merisko, E.M., Ojakian, G.K. y Widnell, C.C. (1981). *The effects of phospholipids on the properties of hepatic 5'nucleotidase*. J. Biol. Chem. **256**, 1983- 1993.

- Merril, A.H. Jr., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A. y Wang, E. (1997). *Sphingolipids- The enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology and pathophysiology*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **142**, 208-225.

- Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M., Superti -Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfrancone, L., y Pelicci, P.G. (1997). *Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF -receptor- MAPkinase-fos signalling pathway*. EMBO J. **16**, 706-716.

- Milovic, V., Deubner, C., Zeuzem, S., Pipper, A., Caspary, W.F., y Stein, J. (1995). *EGF stimulates polyamine uptake in Caco -2 cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **206**, 962-968.

- Miners, J.O. y Mackenzie, P.I. (1991). *Drug glucuronidation in humans*. Pharmac. Ther. **51**, 347-369.

-Molinolo, A.A., Lanari, C., Charreau, E., San Juan, N. y Pasqualini, C. (1987). *Mouse mammary tumors induced by hidroxiprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormone receptors*. J. Clin. Invest. **79**, 1341-1350.

-Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J. y Wolfman, A. (1993). *Complexes of Ras. GTP with Raf-1 and mitogen activated protein kinase kinase*. Science **260**, 1658-1661.

-Moore, M.R. (1993). *Biochemistry of porphyria (Review)*. Int. J. Biochem. **25**, 1353-1368.

-Moriya, M., Matsumura, F. y Kalimi, G.H. (1986). *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p - dioxin reduces high-affinity binding of epidermal growth factor to cell surface receptors in C3H 10T3 cells*. J.Biochem. Toxicol. **1**, 45 -54.

-Moshier, J.A., Panas, E.G., Dosescu, J., Tureaud, J., Skunca, M., y Majumdar, A.P.N. (1995). *Ornithine decarboxylase transformation of NIH/3T3 cells is mediated by altered epidermal growth factor receptor activity*. Cancer Res. **55**, 5358-5365.

-Mylchreest, E. y Charbonneau (1997). *Studies on the mechanism of Uroporphyrinogen Decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene- induced porohyria in the female rat*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **145**, 23-33.

-Nebert, D.W. (1979). *Genetic differences in the induction of monooxygenase activities by polycyclic aromatic compounds*. Pharmacol. Ther. **6**, 395-417.

-Nebert, D.W. y González, F.J. (1987). *P450 genes: structure, evolution y regulation*. Annu. Rev. Biochem. **56**, 945.

-Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K. y Huang, H.G., (1994). *A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 7727-7731.

- Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Wartmann, M., Raden, D.L. y Davis, R.J. (1991). *Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669.* J. Biol. Chem. **266**, 15266-15276.

- Olivera, A. y Spiegel, S. (1993). *Sphingosine-1-phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.* Nature **365**, 557-560.

- OMS- PNUMA (1992). *Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura.* Organización Mundial de la Salud. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 128 pp.

- Orr, J.W., Keranen, L.M. y Newton, A.C. (1992). *Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol.* J.Biol. Chem. **267**, 15263- 15266.

- Panayotou, G. y Waterfield, M.D. (1993). *The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases.* BioEssays **15**, 171 -177.

- Pawson, T. y Schlessinger (1993). *Current Biology* **3**, 434-442.

- Peak y Agius (1994). *Inhibition of glycogen synthesis by epidermal growth factor in hepatocytes. The role of cell density and pertussis toxin -sensitive GTP-binding proteins.* Eur. J. Biochem. **227**, 529-536.

- Pearson, R.B. y Kemp, B.E. (1990). *Trends. Biochem. Sci.* **15**, 342-346.

- Pearson, R.B. y Kemp, B.E. (1991). *Methods Enzymol.* **200**, 62-81.

- Pegg, A.E. y McCann, P.P. (1982). *Polyamine metabolism and function*. Am. J. Physiol. **243**, c212-221.
- Pegg, A.E. (1986). *Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes*. Biochem. J. **234**, 249-262.
- Pegg, A.E. (1988). *Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy*. Cancer Res. **48**, 759- 774.
- Pegg, A.E. y McCann, P.P. (1988). *Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans*. I.S.I. Atlas of Science: Biochemistry, pp. 11-18.
- Pegg, A.E., Shantz, L.M. y Coleman, C.S. (1994). *Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation*. *Polyamines in Clinical and Basic Science*. En: Biochem. Soc. Trans. **22**, 846-852.
- Persson, L., Svensson, F. y Lökvist Wallström, E. (1996). *Regulation of polyamine metabolism*. En: *Polyamines in Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Approaches* (K. Nishioka, ed.), pp. 14-43. R. G. Landes Company, Austin. ISBN 1-412-11051-2.
- Peters, H.A., Goiman, A., Cripps, D.J., Bryon, G.F. y Dogramaci, I. (1982). *Epidemiology of Hexachlorobenzene induced porphyria in Turkey*. Arch. Neurol. **39**, 744-749.
- Peters, H.A., Crips, D., Gocmen, A., Bryan, G., Erturk, E. y Morris, C. (1987). *Turkish epidemic hexachlorobenzene porphyria. A 30-year study*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **514**, 183-190.
- Peterson, R.E., Madhukar, B.V., Yang, K.H., y Matsumura F. (1979). *Depression of adenosine triphosphatase activities in isolated liver surface membranes of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated rats: correlation with effects on ouabain biliary excretion y bile flow*. J. Pharmac. Exp. Ther. **210**, 275-282.

-Pinto, M., Montes, L., Anrique, R., Carrillo, R., Tamayo, R., y Cristi, R. (1990). *Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de vaca y su relación con alimentos para uso animal como fuentes de contaminación.* Arch. Med. Vet. de Chile **22**, 143-153.

-Pike, L.J., Marquardt, H., Todaro, G.J., Gallis, B., Casnellie, J.E., Bornstein, P. y Krebs, E.G. (1982). *Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner.* J. Biol. Chem. **257**, 14628-14631.

-Pike, L.J. y Eakes, A.T. (1987). J. Biol. Chem. **262**, 1644-1651.

-Poellinger, L., Whitelaw, M., Pongratz, Y., y Wilhemsson, A. (1993). *Ligand- and phosphorylation-dependent heterodimerization and DNA binding activity of the bHLH dioxin receptor and the bHLH Arnt coregulator.* J. Cell Biochem. Suppl **17A**, 186.

-Poland, A. y Knutson, J.C. (1982). *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **22**, 517-554.

-Poulin, R., Lu, L., Ackerman, B., Bey, P. y Pegg, A.E. (1992). J. Biol. Chem. **267**, 150-158.

-Prigent, S.A. y Lemoine, N.R. (1992). *The type 1 (EGFr-related) family of growth factor receptors and their ligands.* Prog in Growth Factor Res. **4**, 1-24.

-Prystowsky, J.H., Clevenger, C.V. y Zheng, Z.S. (1993). *Epidermal growth factor induces ornithine decarboxylase in SV40-immortalized human keratinocytes.* Exp. Dermatol. **2**, 125-132.

-Puga, A., Nebert, D.W. y Carrier, F. (1992). *Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1*. DNA Cell Biol. **11**, 269-281.

-Pyne, N.J., Cushley, W., Nimmo, H.G., y Houslay, M.D. (1989). *Insulin stimulates the tyrosyl phosphorylation and activation of 52 kDa peripheral plasma - membrane cyclic AMP phosphodiesterase in intact hepatocytes*. Biochem. J. **261**, 897-904.

-Ralston, R., y Bishop, J.M. (1985). *The product of the protooncogene c-src is modified during the cellular response to platelet -derived growth factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7845-7849.

-Randi, A.S., Sancovich, H.A., Ferramola de Sancovich, A.M., Loaiza, A.I., Kölliker Frers, R.A., Spinelli, F. y Kleiman de Pisarev, D.L. (1999). *Dose-response relationships in hepatic protein phosphorylation y epidermal growth factor receptor levels in hexachlorobenzene-intoxicated rats*. (en prensa).

-Reddy, C.C., Wells, A. y Lauffenburger, D.A. (1994). *Proliferative response of fibroblasts expressing internalization- deficient epidermal growth factor (EGF) receptors is altered via differential EGF depletion effect*. Biotechnol. Prog. **10**, 377-384.

-Reeves, S.A., Sinha, B., Baur, Y., Reinhold, D., y Harsh, G. (1995). *An alternative role for the src-homology-domain-containing phosphotyrosine phosphatase (SH-PTP2) in regulating epidermal-growth -factor-dependent cell growth*. Eur. J. Biochem. **233**, 55-61.

-Rhee, S.G. y Choi, K.D. (1992). *Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes*. J. Biol. Chem. **267**, 12393-12396.

-Richards, D.E., Rega, A.F. y Garrahan, P.J. (1978). *Two classes of site for ATP in the calcium-ATPase from human red cell membranes*. Biochem. Biophys. Acta **511**,

194-201.

-Ríos de Molina, M. del C., Billi, S.C., y San Martín de Viale, L.C. (1987). *Does feeding of hexachlorobenzene promote structural changes in rat - liver porphyrinogen carboxy-lyase*. En: *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium* (C.R. Morris and J.R.P. Cabral, Eds.), pp. 481- 486. IARC, Oxford Press, Oxford.

-Rosenberg-Hasson, Y., Strumpf, D. y Kahana, C. (1991). *Eur. J. Biochem.* **197**, 419-424.

-Rubin, R.A., O'Keefe, E.J. y Earp Shelton, N. (1982). *Alteration of epidermal growth factor dependent phosphorylation during rat liver regeneration*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 776-780.

-Rudinger, A., Mylotte, K.M., Davis, P.J., Davis, F.B. y Blas, S.D. (1984). *Rabbit myocardial membrane Ca^{2+} -ATPase activity stimulation in vitro by thyroid hormone*. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 379-385.

-Ruff-Jamison, S., McGlade, J., Pawson, T., Chen, K. y Cohen, S. (1993). *Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHC in the mouse*. *J. Biol. Chem.* **268**, 7610-7612.

-Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y., e Hirai, H. (1994). *A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner*. *EMBO J.* **13**, 3748-3756.

-Schechter, Y., y Karlsh, S.J.D. (1980). *Insuline-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions*. *Nature* **284**, 556-558.

-Schmidt, J.V. y Bradfield, C.A. (1996). *AH Receptor signalling pathways*. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**, 55- 89.

- Schuber, F. (1989). *Influence of polyamines on membrane function*. Biochem. J. **260**, 1-10.
- Segal, J. e Ingbar, S.H. (1979). *Stimulation by triiodothyronine of the in vitro uptake of sugars by rat thymocytes*. J. Clin. Invest. **63**, 507 -515.
- Seeger, R. y Krebs, E.G. (1995). *The MAPK signalling cascade*. FASEB J. **9**, 726-735.
- Seiler, N. (1970). *Use of the dansyl reaction in biochemical analysis*. In: Methods of biochemical analysis, Glick, D. (ed). Interscience Publ., New York, 18: 259-337.
- Sewall, C.H., Lucier, G.W., Earp, H.S. y Clark, G.C. (1994). *Regulation of rat liver epithelial cell growth and epidermal growth factor receptor by TCDD*. Mol. Pharmacol. submitted for publication.
- Sewall, C.H., Clarck, G.C. y Lucier, G.W. (1995). *TCDD reduces rat hepatic epidermal growth factor receptor: comparison of binding, immunodetection and autophosphorylation*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **132**, 263-272.
- Shalloway, D. , y Shenoy, S. (1990). Adv. Cancer Res. **52**, 248-265.
- Shenolikar, S., y Nairn, A.C. (1991). In *Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research* (Eds: P. Greengard, G.A. Robinson), Raven Press, New York, Vol. 23, pp. 1-121.
- Shenoy, S., Chackalaparampil, Y., Bagrodia, S., Lin, P.H., y Shalloway, D. (1992). *Role of p34 cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 7237-7241.
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987). *Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation*. Cell **48**, 913-922.

- Siegrist-Kaiser, C.A., Juge-Aubry, C., Tranter, M.P., Ekenbarger, D.M., y Leonard, J.L. (1990). *Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes: a novel extranuclear action of thyroid hormone*. J. Biol. Chem. **265**, 5296-5302.
- Sistonen, L., Hölttä, E., Lehvälaiho, H., Lehtola, L. y Alitalo, K.J. (1989a). *Activation of a chimeric EGF-R/neu tyrosine kinase induces the FOS/JUN transcription factor complex, glucose transporter y ornithine decarboxylase*. J. Cell Biol. **109**, 1911-1919.
- Sistonen, L., Hölttä, E., Mäkelä, T., Keski-Oja, J. y Alitalo, K. (1989b). *The cellular response to induction of the p21^{c-Ha-ras} oncoprotein included stimulation of jun gene expression*. EMBO J. **8**, 815-822.
- Sjoholm, A. (1993). *Role of polyamines in the regulation of proliferation y hormone production by insulin-secreting cells*. Am. J. Physiol. **264** (Cell Physiol. 33): C501- C518.
- Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.J. Jr., Backer, J.M., Ullrich, A. y White, M.F. (1993). *The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS-1 and SHC: implications for insulin control of rat signalling*. EMBO J. **12**, 1929-1936.
- Skubitz, K.M. y Gueli, S.A. (1991). *Basic fibroblast growth factor is a substrate for phosphorylation by human neutrophil ecto-protein kinase activity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **174**, 49-55.
- Sopena de Kracoff, Y.E., Ferramola de Sancovich, A.M., Sancovich, H.A. y Kleiman de Pisarev, D.L. (1994). *Effects of thyroidectomy and thyroxine on hexachlorobenzene induced porphyria*. J. Endocrinol. Invest. **17**, 301-305.
- Sorkin, A. y Carpenter, G. (1991). *Dimerization of internalized growth factor receptors*. J. Biol. Chem. **266**, 23453- 23460.

- Stewart, F.P. y Smith, A.G. (1986). *Metabolism of the "mixed" cytochrome P - 450 inducer hexachlorobenzene by rat liver microsomes*. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2163-2170.
- Swarup, G., Cohen, S., y Garbers, D.L. (1982). *Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1104-1109.
- Sweeney, G.D. (1986). *Porphyria cutanea tarda, or the uroporphyrinogen decarboxylase deficiency diseases*. *Clin. Biochem.* **19**, 3-14.
- Tamura, S., Brown, T.A., Whipple, J.H., Fujita-Yamaguchi, Y., Dubler, R.E., Cheng, K., y Larner, J. (1984). *A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes*. *J. Biol. Chem.* **259**, 6650-6658.
- Taylor, M.J., Lucier, G.W., Mahler, J.F., Thompson, M., Lockhart, A.C. y Clark, G.C. (1992). *Inhibition of acute TCDD toxicity by treatment with anti-tumor necrosis factor antibody or dexamethasone*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **117**, 126-132.
- Taylor, S.J. y Shalloway, D. (1993). *The cell cycle and c -src*. *Curr. Opin Genet. Dev.* **3**, 26-34.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Borrell, A. y Masgrau, C. (1997). *Polyamine metabolism and its regulation*. *Physiologia Plantarum* **100**, 664-674.
- Tonks, N.K., Cicirelli, M.F., Diltz, C.D., Krebs, E.G. y Fisher, E.H. (1990). *Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in Xenopus oocytes*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 458-463.
- Tremblay, L. y Beliveau, R. (1994). *Protein tyrosine phosphorylation in normal rat tissues*. *Int. J. Biochem.* **26**, 29-34.

-Tullis, K., Olsen, H. Bombick, D.W., Matsumura, F. y Junkun, J. (1992). *TCDD causes stimulation of c-ras expression in the hepatic plasma membranes in vivo and in vitro*. J. Biochem. Toxicol. **7**, 107-116.

-Tung, H.Y.L., Alemany, S., y Cohen, P. (1985). *The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Purification, subunit structure and properties of protein phosphatases-2AO, 2A1 and 2A2 from rabbit skeletal muscle*. Eur. J. Biochem. **148**, 253-263.

-Ueki, H., Yamasaki, Y., Higo, K., Motoyashiki, T., Kawabata, H. y Morita, T. (1995). *Regulation of cyclic AMP phosphodiesterase activity by particulate protein tyrosine kinase and phosphotyrosine phosphatase activities sensitive to sodium orthovanadate*. Biol. Pharm. Bull. **18**, 214-218.

-van Birgelen, A.P.J.M., Fase, K.M., van der Kolk, J., Poiger, H., Brouwer, A., Seinen, W. y van den Berg, M. (1996). *Synergistic effect of 2,2', 4,4', 5,5',-hexachlorobephenyl and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic porphyrin levels in the rat*. Environ. Health Persp. **104**, 550-557.

-van der Geer, P., Hunter, T. y Lindberg, R.A. (1994). *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251-337.

-Van de Vijver, M.J., Kumar, R., y Mendelsohn, J. (1991). *Ligand-induced activation of A431 cell epidermal growth factor receptors occurs primarily by an autocrine pathway that acts upon receptors on the surface rather than intracellularly*. J. Biol. Chem. **266**, 7503-7508.

-Van Ommen, B., Adang, A.E.P., Brader, L., Posthumus, M.A., Muller, F. y Van Bladeren, P.J. (1986). *The microsomal metabolism of hexachlorobenzene*. Biochem. Pharmacol. **19**, 3233-3238.

-Van Ommen, B., Adang, A.E.P., Brader, L., Posthumus, M.A., Muller, F. y Van Bladeren, P.J. (1989). *The relation between the oxidative bi otransformation of hexachlorobenzene y its porphyrinogenic activity*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **100**, 517-528.

- van Raaij, J.A.G.M., van den Berg, K.J., Engel, R., Bragt, P.C. y Notten, W.R.F. (1991). *Effects of hexachlorobenzene y its metabolites pentachlorophenol y tetrachlorohydroquinone on serum thyroid hormone levels in rats*. *Toxicology* **67**, 107-116.
- van Raaij, J.A.G.M., Kaptein, E., Visser, T.J., y van den Berg, K.J. (1993a). *Increased glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene -treated rats*. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 627-631.
- van Raaij, J.A.G.M., Frijters, C.M.G., y van den Berg, K.J. (1993b). *Hexachlorobenzene-induced hypothyroidism. Involvement of different mechanisms by parent compound y metabolite*. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1385-1391.
- Vilgrain, I. y Baird, A. (1991). *Phosphorylation of basic fibroblast growth factor by a protein kinase associated with the outer surface of a target cell*. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1003-1012.
- Visser, T.J., Rutgers, M., de Herder, W.W., Rooda, S.J.E. y Hazenberg, M.P. (1988). *Hepatic metabolism, biliary clearance y enterohepatic circulation of thyroid hormone*. *Acta Med. Austriaca* **15**, 37.
- Visser, T.J., Kaptein, E., van Toor, H., van Raaij, J.A., van den Berg, K.J., Joe, C.T., van Engelen, J.G. y Brouwer, A. (1993). *Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: Effects of in vitro treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions*. *Endocrinology* **133**, 2177-2186.
- Visser, T.J. (1996). *Pathways of thyroid hormone metabolism*. *Acta Med. Austriaca* **23**, 10-16.
- Vizethum, W. y Goerz, G. (1979). *Induction of the hepatic microsomal y nuclear cytochrome P-450 system by hexachlorobenzene, pentachlorophenol y trichlorophenol*. *Chem. Biol. Interact.* **28**, 291.

- Wainstock de Calmanovici, R., Ríos de Molina, M. del C., Taira de Yamasato, M.C., Tomio, J.M. y San Martín de Viale, L.C. (1984). *Mechanism of hexachlorobenzene-induced porphyria in rats. Effect of phenobarbitone pretreatment.* Biochem. J. **218**, 753-763.
- Ware, M.F., Tice, D.A., Parsons, S.J., y Lauffenburger, D.A. (1997). *Overexpression of cellular Src in fibroblasts enhances endocytic internalization of epidermal growth factor receptor.* J. Biol. Chem. **272**, 30185- 30190.
- Wassermann, D., Wassermann, M., y Djavaherian, M. (1971). *Effect of organochlorine insecticides on serum PBI level in occupationally exposed people.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. **6**, 85.
- Waters, S.B., Yamauchi, K. y Pessin, J.E. (1993). *Functional expression of insulin receptor substrate-1 is required for insulin-stimulated mitogenic signaling.* J. Biol. Chem. **268**, 22231-22234.
- Weiss, S.J., McKinney, J.S. y Putney, Jr., J.W. (1982). *Regulation of phosphatidate synthesis by secretagogues in parotid acinar cells.* Biochem. J. **204**, 587-592.
- Wen-Chun Hung, Lea-Yea Chuang, Juei-Hsiung Tsai and Chun - Chang Chang (1993). *Effects of epidermal growth factor on growth control and signal transduction pathways in different human hepatoma cell lines.* Biochem. Mol. Biol. International **30**, 319-328.
- Whetton, A.D. y Houslay, M.D. (1983). *5'Nucleotidase is activated upon cholesterol-depletion of liver plasma membranes.* FEBS Lett. **157**, 70-74.
- White, M.F. y Kahn, C.R. (1994). *The insulin signaling system.* J. Biol. Chem. **269**, 1-4.
- WHO (1974). *Evaluation of some pesticides residues in food.* WHO Pesticide Residues Series 4. Geneva.

-Williams-Ashman y Pegg (1981). *Aminopropyl group transfers in polyamine biosynthesis*, Chapter 2, p. 43-73. En: *Polyamines in Biology and Medicine*. Edited by David R. Morris y Laurence J. Marton, 459 pp.

-Willingham, M.C., Haigler, H.T., Fitzgerald, D.J.P., Gallo, M.G., Rutherford, A.V. y Pastan, I.H. (1983). *The morphologic pathway of binding and internalization of epidermal growth factor in cultured cells*. *Exp. Cell Res.* **146**, 163-175.

-Wojciechowski, K., Trzeciak, L., Konturek, S.J. y Ostrowski, J. (1995). *Inhibition of acid secretory response y induction of ornithine decarboxylase y its mRNA by TGF α y EGF in isolated rat gastric glands*. *Regul. Pept.* **56**, 1-8.

-Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J. y Sturgill, T.W. (1993). *Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signalling pathway by adenosine 3'-5'-monophosphate*. *Science* **262**, 1065-1069.

-Xue, G.Z., Zheng, Z.S., Chen, R.Z., Lloyd, M.B. y Prystowsky, J.H. (1996). *Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits epidermal growth factor signalling in human keratinocytes, leading to decreased ornithine decarboxylase activity*. *Biochem. J.* **15**, 641-648.

-Yarden, Y. y Schlessinger, J. (1987a). *EGF induces rapid reversible aggregation of the EGF-receptor*. *Biochemistry* **26**, 1443-1451.

-Yarden, Y. y Schlessinger, J. (1987b). *Biochemistry* **26**, 1434-1442.

-Yarden, Y. y Ullrich, A. (1988). *Growth factor receptor tyrosine kinases*. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443-478.

-Zimmerman, B.J., McCormack, S.A., Israel, M. y Johnson, L.R. (1995). *Polyamine-mediated cell migration y growth: structural requirements for diamine analogues to substitute for putrescine*. *Cell. Pharmacol.* **2**, 109-113.