

Tesis Doctoral

Efecto del hexaclorobenceno sobre la regulación del crecimiento de células foliculares tiroideas. Estudios in vivo e in vitro

Chiappini, Florencia Ana

2012

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

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

Cita tipo APA:

Chiappini, Florencia Ana. (2012). Efecto del hexaclorobenceno sobre la regulación del crecimiento de células foliculares tiroideas. Estudios in vivo e in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Chiappini, Florencia Ana. "Efecto del hexaclorobenceno sobre la regulación del crecimiento de células foliculares tiroideas. Estudios in vivo e in vitro". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Efecto del hexaclorobenceno sobre la regulación del crecimiento
de células foliculares tiroideas. Estudios *in vivo* e *in vitro*.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Biológica

Lic. Florencia Ana Chiappini

Directora de tesis: Dra. Diana L. Kleiman

Consejera de Estudios: Dra. María del Carmen Ríos de Molina

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales.
Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Buenos Aires, 2012

Efecto del hexaclorobenceno sobre la regulación del crecimiento de células foliculares tiroideas. Estudios *in vivo* e *in vitro*.

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental altamente persistente y ubicuo, que produce efectos deletéreos para la salud humana. La exposición de animales de laboratorio al mismo, induce disfunciones endocrinas tiroideas (Kleiman de Pisarev et al., 1990, Alvarez et al., 2004), reproductivas (Foster et al., 1992; Alvarez et al., 2000) e inmunomodulación (Ezendam et al., 2004) entre otros efectos.

El HCB se localiza en una variedad de tejidos y fluidos humanos con un amplio rango de concentraciones según el contenido lipídico y el grado de exposición al mismo. En trabajos previos demostramos que el tratamiento de ratas con HCB (1000 mg/kg p.c.) produce una disminución de los niveles circulantes de 3,3',5,5'-tetraiodotironina (T₄) total, y un aumento en la concentración sérica de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), sin alterar el peso tiroideo (Kleiman de Pisarev et al., 1989). Estos datos sugerían la existencia de algún mecanismo inhibitorio del crecimiento tiroideo, o pro-apoptótico desencadenado por el HCB.

En base a los antecedentes de la literatura y a nuestros resultados previos, nos propusimos como objetivo general, investigar las bases bioquímicas y moleculares del mecanismo de acción del HCB sobre la regulación del crecimiento celular tiroideo. Para ello estudiamos la apoptosis, la proliferación celular, el estado oxidativo y las cascadas de señalización de receptores de factores de crecimiento (RFC), realizando estudios *in vivo* en ratas hembras Wistar e *in vitro* en células foliculares tiroideas de rata Fisher (FRTL-5).

Demostramos que el HCB administrado a ratas durante 30 días, en dosis que no modifican el status tiroideo (1-100 mg/kg p.c.), aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) y la apoptosis a través de la vía mitocondrial, promoviendo la liberación del citocromo *c*, de la mitocondria hacia el citosol y la activación de la caspasa-9.

Los estudios en células FRTL-5, demostraron que el HCB incrementa la expresión de TGF-β1, disminuye la expresión de tiroglobulina (TG) e induce la apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de caspasas. El aumento en la producción de ROS y subsecuente activación de ERK1/2, están asimismo involucrados en el efecto apoptótico del HCB. Por otra parte, el plaguicida induce un desbalance en proteínas involucradas en el control de la progresión del ciclo celular llevando a un arresto en las fases G₁ y G₂/M, del mismo.

En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez, que el HCB induce un desbalance en la homeostasis del crecimiento celular y disfunción tiroidea.

Palabras Clave: HCB, Apoptosis, ROS, TGF-β1, MAPKs, ciclo celular

Effect of hexachlorobenzene on the regulation of thyroid follicular cells growth. *In vivo* and *in vitro* studies.

Hexachlorobenzene (HCB) is a widespread and persistent environmental pollutant with deleterious effect on human health. Chronic administration of HCB to laboratory animals elicits a number of effects including, thyroid (Kleiman de Pisarev et al., 1990, Alvarez et al., 2004) and reproductive dysfunctions (Foster et al., 1992; Alvarez et al., 2000) and immunopathology (Ezendam et al., 2004). HCB is found in a variety of human tissues and fluids with a wide range of values depending on the dose and time of exposure, and on the tissue lipid content.

We have demonstrated that HCB administration (1000 mg/kg b.w), reduced total serum 3,3',5,5'-tetraiodothyronine (T₄) levels, increased thyroid stimulating hormone (TSH) levels, but had no effect on thyroid weight in rats (Kleiman de Pisarev et al., 1989). As TSH stimulates thyroid follicular cell proliferation, our data suggested the existence of a thyroid growth inhibitory mechanism, or a pro-apoptotic effect, triggered by the HCB.

The aim of the present study was to determine the biochemical and molecular mechanism of action of HCB, on the regulation of thyroid follicular cells growth. We examined parameters of apoptosis, cell proliferation, oxidative status and growth factor receptor (GFR) signaling pathways *in vivo*, in female Wistar rats, and *in vitro*, in Fischer rat thyroid cell line (FRTL-5).

Our results showed that HCB administered to Wistar rats during 30 days, at doses that do not disrupt thyroid economy (1-100 mg/kg p.c.), induce transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) expression and apoptosis in the thyroid gland, involving the mitochondrial pathway. HCB promotes cytochrome *c* release from the mitochondria and caspase-9 activation.

In FRTL-5 cell line, HCB increases TGF- β 1 expression, decreases thyroglobulin (TG) protein levels, and induces apoptosis through a caspase dependent and independent mechanism, involving ROS production and ERK1/2 activation. In addition, HCB induces alterations in cell cycle regulatory proteins, and G₁ and G₂/M cell cycle arrest.

In conclusion, our results show for the first time, that HCB induces an imbalance in the homeostasis of follicular thyroid cells growth and thyroid dysfunction.

Keywords: HCB, Apoptosis, ROS, TGF- β 1, MAPKs, Cell Cycle.

Me hago Doctora.

Otra etapa concluida, llena de éxitos, fracasos, frustraciones, alegrías, acierto y desaciertos. Llena de gente linda que hizo más fácil el camino, que me acompañó, guió y aconsejó. Gente incondicional, que no quiero dejar de recordar y agradecerle con todo mi corazón haber estado durante estos 5 años de doctorado.

...A la Dra. Diana Kleiman, por creer en mí y por haberme permitido pertenecer a este fantástico grupo de trabajo. Hace ya más de 7 años, llegué al labo siendo sólo una estudiante de licenciatura, con muchas cosas por aprender, con mucho camino que recorrer. El tiempo pasó y bajo su dirección, me licencié y ahora ya casi con el título de doctora en la mano. Gracias!!!

...A Lauri y Andy, dos personas excelentes, las quiero chicas!!. Gracias por acompañarme, por estar siempre, por la contención, por escucharme esos días complicados, por los consejos. Por el café con leche diluido, gracias mamá Lauri!. Y por la lucha incesante, gracias Andy!.

...A Marce, mi compañera de limpieza extrema! Jaja!. Gracias por tu compañía!.

...A los técnico y técnicas del labo, Graciela, Priscila, Roberto y David, gracias por su ayuda!

...A Ana Clara, Delfi y Lauri, gracias por los lindos momentos compartidos, los mates y las leches chocolatadas! Fue muy lindo compartir parte de este camino con ustedes!

...A Carito, mi gran compañera de mesada. Por las mañanas de mate y charla, entre pipeteo y pipeteo. Por estar siempre!. Caro, sos una muy linda persona y sé que este año te espera lleno de cosas buenas. Me da mucha alegría poder seguir compartiendo la mesada con vos!

...A Mechi, mi amiga y vecina del labo. Desde la facu venimos compartiendo este camino juntas, gracias por tu compañía, tu amistad, tus consejos, por escucharme siempre. Sabés que te debo la felicidad! Jajaja. Mechita, siempre va a haber en mi casa una camita para vos!!!

...A Coqui y Chiappini, mis papás. Los quiero! Gracias por confiar en mí y apoyarme siempre. Aprendí de ustedes que en la vida hay que luchar para conseguir lo que uno desea, y que siempre, pase lo que pase ustedes van a estar a mi lado!!!

...A Manu, mi hermana. Te quiero Manu! Sos mi compañera de viaje, gracias por ayudarme siempre!!

...A la abuela, por sus rezos incansables. Te quiero abue!

...A mi amor, mi Chiquillo, gracias por acompañarme siempre, por los domingos en el cuarto de cultivo, por tu apoyo incondicional, por tu paciencia y consejos en momentos difíciles. Sos mi compañero de vida y junto a vos espero seguir creciendo, no sólo como profesional, sino como persona. Te amo!

“Somos un mar de fueguitos...

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.”

El Mundo de Eduardo Galeano.

ABREVIATURAS



4,7 PHE: 4,7 ortofenantrolina

8-OH-dG: 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

ADP: Adenosin difosfato

AhR: del inglés "Aryl Hydrocarbon", Receptor de Hidrocarburos Aromáticos

AIF: del inglés "Apoptosis Inducing Factor", Factor inductor de apoptosis

ALK: del inglés "Activin receptor Like Kinasa"

ANF: α -Nactoflavona

AP-1: del inglés, "Activator Protein-1", proteína activadora-1

Apaf-1: del inglés "Apoptotic Protease Activating Factor 1"

APC/C: del inglés "Anaphase promoting complex", Complejo promotor de la Anafase

ARNT: del inglés "Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator", Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos aromáticos

ATP: Adenosin trifosfato

ATP: Adenosina trifosfato

Bad: del inglés "BCL2-associated Agonist of cell Death"

Bax: del inglés "BCL2-Associated X protein"

Bcl-2: del inglés "B-Cell leukemia/Lymphoma 2"

Bcl-XL: del inglés "B-Cell Lymphoma-Extra Large"

BH2/3: del inglés "Bcl-2 Homology"

Bid: del inglés "BH3 Interacting Domain death agonist"

BSA: albumina de suero bovina

CDKs: del inglés "Cyclin Dependent Kinases", Quinasas dependientes de ciclinas

CIP/KIP: CDKs inhibitor proteins)

CKIs: del inglés "Cyclin dependent Kinase Inhibitor proteins", Proteínas inhibidoras de CDKs

CL: Cardiolipina

COPs: Contaminantes Orgánicos persistentes

CYP: Citocromo P450

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DCF: 2',7'-di-clorofluoresceína

DCHF: 2',7'-di-clorodihidrofluoresceína

DCHFDA: 2',7'-di-clorodihidrofluoresceína diacetato

DMEM: del inglés "Dubelco Modified Eagle Medium"

DMSO: Dimetilsulfóxido

DRE: del inglés "Dioxin Response Elements", elementos de respuesta a dioxinas

DRP1: del inglés "Dynamin Related Protein-1", Proteína relacionada con las Dinaminas 1

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Acido etilendiaminotetracético

EGF: del inglés "Epidermal Growth Factor", Factor de crecimiento epidérmico

EGTA: Glicol-bis(2-aminoetileter)-acido N,N,N'-tetraacético

EMT: del inglés "Epithelial-to-mesenchymal transition", Transición epitelio mesenquimal

EndoG: Endonucleasa G

ERK: del inglés "Extracellular Signals Regulated Kinases", Kinasa regulada por señales extracelulares

FADD: del inglés "Fas-Associated Death Domain"

Fas L: Ligando de Fas

FBS: suero fetal bovino

FGF: del inglés "Fibroblast Growth Factor", Factor de crecimiento de fibroblastos.

FIS-1: Proteína de Fisión 1

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GSH: Glutación o γ -Glutamyl-Cisteinil-glicina

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCB: Hexaclorobenceno

HGF: del inglés "Hepatocyte Growth Factor", Factor de crecimiento de hepatocitos

HSP: del inglés "Heat Shock Protein", Proteína de shock térmico

i.p.: intra-peritoneal

IAP: del inglés "Inhibitor of Apoptosis Protein", Proteína inhibidora de apoptosis

IGF-1: del inglés "Insulin like Growth Factor-1", Factor de crecimiento insulín similar-1

IGF-1-BP: del inglés “Insulin like Growth Factor-1 Binding Protein”, Proteína ligadora IGF-1

INK4: del inglés “Inhibitors of Kinase 4”, Inibidores de la quinasa 4

IP: Ioduro de propidio

JNKs: del inglés “c-Jun N-terminal Kinases”, Kinasa de N-terminal c-jun

KDa: Kilodaltons

L°: Radical alquilo

LDL: del inglés “Low Density Lipoprotein”, Lipoproteína de baja densidad

LOO°: Radical peroxil

LOOH: Hidroperóxido lipídico

MAPK: del inglés “Mitogen Activated Protein Kinases”

MAPK: del inglés “Mitogen Activated Protein Kinases”, Proteínas Kinasas Activada por Mitógenos

MEK del inglés “Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase”, Quinasa regulada por señales mitogénicas extracelulares

Mfn-1 y -2: Mitofusina 1 y 2

MME: Membrana mitocondrial externa

M-MLV RT: del inglés Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Enzima transcriptasa reversa

MPF: del inglés “M-Promoting Factor”, Factor promotor de la fase M

MTT: Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

O₂°: Radical superóxido

O₃: Ozono

OH°: Radical hidroxilo

ONOO°: Peroxinitrito

PAHs: del inglés “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBS: Buffer fosfato salino

PCB: del inglés “Polychlorinated Biphenyls”, Bifenilos Policlorados

PCD: del inglés “Programmed Cell Death”, Muerte celular programada

PCNA: del inglés “Proliferating Cell Nuclear Antigen”, Antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: del inglés “Polymerase Chain Reaction”, Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PS: Fosfatidil serina

PTK: del inglés “Protein Tyrosine Kinase”, Proteína quinasa de tirosina

Rb: Retinoblastoma

RFC: Receptores de Factores de Crecimiento

RIP: del inglés “Receptor Interacting Protein”, Proteína de interacción a receptores

RO°: Radical alcoxilo

RO₂°: Radical peroxilo

ROS: del inglés “Reactive Oxygen Species”, Especies reactivas de oxígeno

S.E.M: error estándar de medida

SDS: Dodecilsulfato sódico

SOD: Superóxido Dismutasa

T₃: 3,5,3'-triodotironina

T₄: 3,3',5,5'-tetraiodotironina o tiroxina

T₄-UDPGT: UDP-glucuroniltransferasa de T₄

TBG: Globulina fijadora de tiroxina

TBS: del inglés Tris Buffer Saline

TCDD: 2,3,7,8, Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TdT: Enzima Transferasa Terminal

TG: Tiroglobulina

TGF-β1: del inglés “Transforming Growth Factor-β1”, Factor de crecimiento transformante-β1

Thr: Treonina

TNF: del inglés “Tumor Necrosis Factor”, Factor de Necrosis Tumoral

TNF-R: Receptor de TNF

TPO: Peroxidasa tiroidea

TRADD: del inglés “TNFR Associated Death Domain”, Proteína de asociación a dominios de muerte

TRAF-2: del inglés “TNFR Associated Factor-2”, Factor de asociación a TNFR-2

TRH: del inglés “Thyrotropin Releasing Hormone”, Hormona liberadora de tirotrófina

TSH: del inglés “Thyroid Stimulating Hormone”, Hormona estimulante de la tiroides o Tirotrófina

TUNEL: del inglés “Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated desoxyuridine triphosphate nick end-labeling”

Tween 20: nombre comercial de polioxietilensorbitan monolaurato

Tyr: Trosina

TβR: Receptor de TGF-β

TβRI: Receptor de TGF-β tipo I

TβRII: Receptor de TGF-β tipo II

TβRIII: Receptor de TGF-βI tipo III

UDPGT1: Uridin-difosfato-glucuronil transferasa 1

VEGF: del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”, Factor de crecimiento vascular endotelial

XRE: del inglés “Xenobiotics Response Elements”, Elementos de respuesta a xenobióticos

ÍNDICE



| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN----- | 1 |
| PLAGUICIDAS, AMBIENTE Y SALUD ----- | 2 |
| CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs) ----- | 3 |
| HEXACLOROBENCENO ----- | 3 |
| Características Generales----- | 3 |
| Vías de absorción----- | 5 |
| Distribución y metabolismo----- | 5 |
| Efectos de la exposición al HCB----- | 6 |
| Efectos sobre la función tiroidea----- | 7 |
| Mecanismo de acción----- | 8 |
| GLÁNDULA TIROIDES ----- | 10 |
| Efectos de las hormonas tiroideas ----- | 12 |
| Efecto sobre el sistema nervioso central----- | 12 |
| Efecto sobre el crecimiento----- | 12 |
| Efecto sobre la termogénesis----- | 13 |
| Efecto sobre el metabolismo----- | 13 |
| Efecto sobre el sistema nerviosos simpático----- | 13 |
| Regulación del crecimiento de la glándula tiroides ----- | 13 |
| TGF-β1 ----- | 14 |
| TGF-β1 y tiroides ----- | 16 |
| APOPTOSIS ----- | 17 |
| Características morfológicas de las células apoptóticas----- | 18 |
| Mecanismos de apoptosis ----- | 19 |
| Vías de señalización ----- | 19 |
| Vía extrínseca----- | 19 |
| CD95----- | 20 |
| TNFR-I----- | 21 |
| Vía intrínseca----- | 22 |
| Vías mediadas por otros orgánulos celulares----- | 26 |
| Apoptosis con morfología diferente ----- | 26 |
| DINÁMICA MITOCONDRIAL ----- | 27 |
| Mediadores moleculares de la fusión y fisión mitocondrial ----- | 30 |
| Fusión----- | 30 |
| Fisión----- | 30 |
| Fisión mitocondrial durante la apoptosis ----- | 31 |
| CICLO CELULAR ----- | 31 |
| Encendido del ciclo celular ----- | 33 |

| | |
|---|-----------|
| Transición G ₁ /S ----- | 33 |
| Transición G ₂ /M ----- | 34 |
| Proteínas inhibitorias del ciclo celular ----- | 35 |
| p27 ^{Kip1} ----- | 36 |
| ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO----- | 37 |
| Fuentes endógenas de ROS----- | 38 |
| Cadena de transporte de electrones mitocondrial ----- | 38 |
| Metabolismo oxidativo de xenobióticos: Enzimas del citocromo P450----- | 39 |
| Otros sistemas enzimáticos de generación de ROS----- | 41 |
| Metabolismo de ácidos grasos dentro de los peroxisomas----- | 41 |
| Estrés Oxidativo----- | 41 |
| Sistemas antioxidantes----- | 42 |
| Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas----- | 44 |
| Papel de los ROS en los proceso de apoptosis----- | 45 |
| LA SUPERFAMILIA DE LAS MAPKs----- | 47 |
| MAPKs y Apoptosis----- | 49 |
| ERK ----- | 49 |
| P38 - JNK MAPK y apoptosis----- | 50 |
| ANTECEDENTES Y OBJETIVOS----- | 51 |
| MATERIALES Y MÉTODOS----- | 54 |
| ESTUDIOS <i>in vivo</i>----- | 55 |
| Productos utilizados----- | 55 |
| Animales y Diseño experimental----- | 55 |
| Parámetros Bioquímicos----- | 56 |
| Estudios inmunohistológicos y morfométricos de la glándula tiroides--- | 57 |
| Tratamiento de los cortes en blanco para técnicas histológicas--- | 57 |
| Histomorfología de la glándula tiroides----- | 57 |
| Técnica de TUNEL----- | 59 |
| Ensayo de proliferación celular----- | 60 |
| Fraccionamiento subcelular----- | 60 |
| ESTUDIOS <i>in vitro</i> ----- | 61 |
| Productos utilizados----- | 61 |
| Cultivo celular ----- | 61 |
| Estudios tiempo y dosis respuesta----- | 62 |

| | |
|---|----|
| Ensayos con inhibidores y antioxidantes ----- | 62 |
| Inhibidores ----- | 63 |
| PD98059 ----- | 63 |
| SP600125 ----- | 63 |
| SB203580 ----- | 64 |
| SB431542 ----- | 64 |
| 4,7 PHE ----- | 65 |
| Antioxidantes ----- | 65 |
| TROLOX ----- | 65 |
| Obtención de proteínas para Western blot----- | 65 |
| Fraccionamiento subcelular----- | 66 |
| Ensayo de viabilidad celular ----- | 66 |
| Tinción con Hoechst----- | 67 |
| Ensayo de TUNEL----- | 67 |
| Morfología mitocondrial----- | 68 |
| Medición de los niveles intracelulares de ROS ----- | 68 |
| Análisis del ciclo celular por citometría de flujo----- | 69 |
| TÉCNICAS GENERALES ----- | 69 |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida----- | 69 |
| Western blot----- | 70 |
| Extracción de RNA----- | 71 |
| RT-PCR----- | 72 |
| Primers utilizados----- | 72 |
| Reacciones de amplificación de TGF- β 1, catalasa, SOD1, L-19, GAPDH----- | 72 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICOS ----- | 73 |
| RESULTADOS ----- | 74 |
| Capítulo I: Modelo <i>in vivo</i>: Ratas Wistar Hembras ----- | 75 |
| I.1. Efecto del HCB sobre el estatus tiroideo ----- | 75 |
| I.1.a. Niveles hormonales séricos ----- | 75 |
| I.1.b. Histomorfología de la glándula tiroidea ----- | 76 |
| I.2. El HCB induce incrementos en los niveles de expresión de TGF- β 1-- | 78 |
| I.3. El HCB no altera la proliferación celular tiroidea ----- | 79 |
| I.4. El HCB induce apoptosis de células foliculares tiroideas ----- | 81 |
| I.5. La apoptosis inducida por el HCB involucra la liberación del citocromo <i>c</i> de la mitocondria y la activación de la caspasa-9 ----- | 83 |

| | |
|--|----|
| I.6. El HCB no induce el clivaje proteolítico de la caspasa-8 ----- | 84 |
| I.7. El HCB aumenta los niveles de expresión de la enzima antioxidante catalasa ----- | 85 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo II: Modelo <i>in vitro</i>: Células FRTL-5----- | 87 |
| II.1. El HCB induce la expresión de TGF- β 1 en células FRTL-5 ----- | 87 |
| II.2. El HCB no incrementa la proliferación de células FRTL-5 ----- | 88 |
| II.3. Efecto del HCB sobre la viabilidad celular ----- | 90 |
| II.4. El TGF- β 1 no está involucrado en la pérdida de viabilidad celular inducida por el HCB, a través de la señalización por proteínas SMAD--- | 91 |
| II.5. La pérdida de viabilidad inducida por el HCB no es dependiente del AhR ----- | 92 |
| II.6. La exposición al HCB induce la apoptosis de células FRTL-5 ----- | 93 |
| II.7. Efecto del HCB sobre parámetros funcionales de células FRTL-5----- | 98 |
| II.8. El HCB induce la activación de caspasas iniciadoras de la vía de receptores de muerte ----- | 99 |
| II.9. El HCB induce la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria hacia el citosol ----- | 103 |
| II.10. El HCB induce alteraciones en la morfología y pérdida del potencial de membrana mitocondrial----- | 106 |
| II.11. El HCB incrementa los niveles intracelulares de ROS ----- | 108 |
| II.12. El incremento en los niveles intracelulares de ROS está involucrado en la apoptosis inducida por el HCB ----- | 112 |
| II.13. El HCB induce la activación de las vías de señalización de MAPKs en las células FRTL-5----- | 114 |
| II.14. La activación de ERK1/2 está involucrada en la apoptosis inducida por el HCB en células FRTL-5 ----- | 120 |
| II.15. La activación de JNK, no está involucrada en la apoptosis inducida por el HCB en células FRTL-5----- | 122 |
| II.16. La activación de p38 MAPK, no está involucrada en la apoptosis inducida por el HCB en células FRTL-5 ----- | 124 |
| II.17. La activación de ERK1/2 inducida por el HCB es dependiente de la generación de ROS ----- | 126 |
| II.18. El HCB induce alteraciones en los niveles intracelulares de proteínas reguladoras del ciclo celular: p27 ^{Kip1} y Ciclina D1 ----- | 126 |
| II.19. Efecto del HCB sobre el ciclo celular de células FRTL-5 ----- | 131 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| DISCUSIÓN | -----133 |
| MODELO PROPUESTO | ----- 145 |
| BIBLIOGRAFÍA | ----- 146 |

INTRODUCCIÓN



PLAGUICIDAS, AMBIENTE Y SALUD

En el transcurso de los últimos 150 años, el hombre ha fabricado una amplia gama de compuestos químicos con el fin de satisfacer las necesidades crecientes del desarrollo tecnológico y mejorar su calidad de vida. Desde el inicio de la revolución industrial, se estiman en más de 120.000 las sustancias químicas sintéticas, y los subproductos derivados de éstas, producidos por la actividad humana, número que se incrementa día tras día y que parece no tener fin si se considera que se incorporan a la lista cerca de 2.000 nuevos compuestos cada año.

La liberación de dichas sustancias químicas al medioambiente hace que los seres vivos resulten altamente expuestos a los efectos nocivos de los mismos. Las consecuencias entre la interacción de los seres vivos y muchos de estos compuestos, no siempre son bien conocidas, pero se ha advertido sobre la toxicidad de algunos de ellos prohibiéndose su uso, como es el caso del fungicida organoclorado, hexaclorobenceno (HCB).

La producción agrícola representa uno de los sectores más desarrollados en el uso de sustancias químicas, como plaguicidas, fungicidas, herbicidas y fertilizantes. Desde los inicios de la civilización el hombre ha luchado incesantemente para mejorar sus condiciones de vida. En su afán de producir provisiones necesarias de alimentos, ha combatido los estragos ocasionados por plagas de insectos y por las enfermedades de las cosechas. Los relatos de calamidades como la destrucción de cultivos por diversas plagas predominan en los primeros registros escritos, hay muchas de estas referencias en la Biblia, donde las plagas son vistas como un castigo de Dios por los pecados cometidos por los hombres.

Gracias al empleo de los plaguicidas, las cosechas se han visto incrementadas significativamente y las pérdidas en la producción agrícola se han reducido de manera muy significativa (Hotchkiss, 1992). Si bien, el empleo de estos compuestos, ha producido innumerables beneficios en los programas de control de enfermedades transmitidas por vectores o con huéspedes intermediarios (Maroni y Fait, 1993), el riesgo potencial, que implica su uso, para la vida animal e inclusive humana de la exposición a dichos compuestos químicos, no debe dejar de señalarse (Longnecker et al., 1997).

La exposición humana a los plaguicidas persistentes es una realidad, si bien sus consecuencias empiezan a verse recién ahora, luego de que más de una generación ha sufrido una alta exposición medioambiental. Las consecuencias a largo plazo de la exposición a plaguicidas se manifiestan sobre el desarrollo y funcionalidad de diversos órganos y sistemas, abarcando alteraciones neurológicas, reproductivas, endocrinas, inmunológicas y desarrollo de diferentes tumores (ATSDR, Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 2002).

CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs)

Los COPs, conocidos internacionalmente por sus siglas en inglés, POPs (Persistent Organic Pollutants), son un conjunto de compuestos orgánicos fabricados artificialmente por el hombre. Se trata de compuestos halogenados que se caracterizan por su alta lipofilidad, lo que da lugar a que se bioacumulen en el tejido adiposo de los seres vivos ingresando, de esta manera, en la cadena trófica. Son altamente persistentes en el medio ambiente, dado que en diversa medida, son resistentes a la degradación fotolítica, biológica y química. Además, son compuestos semivolátiles, los que les permite presentarse en forma de vapor o adsorbidos por partículas atmosféricas facilitando así, su transporte a grandes distancias en la atmósfera antes de su deposición. Estas propiedades de persistencia y semivolatilidad, han permitido que se distribuyan por todo el planeta, dándoles la particularidad de ser compuestos sumamente ubicuos.

Aunque pueden existir muchas formas diferentes de COPs, los que se destacan por su característica de persistencia, bioacumulación y toxicidad, son principalmente tres grupos. Los plaguicidas e insecticidas, ejemplos de estos son el Aldrín, Dieldrín, Endrín, Clordano, DDT, HCB, Heptacloro, Mirex y Toxafeno entre otros. Los bifenilos policlorados (PCB), utilizados fundamentalmente como materiales aislantes y aceites refrigerantes para transformadores y fluidos hidráulicos. Y por último las dioxinas y furanos, los cuales son los únicos que no son producidos comercialmente, ni se les conoce ninguna utilidad o aplicación. Estos últimos, son generados como resultado de la combustión de compuestos organoclorados, o como subproducto de procesos industriales en los que interviene el cloro.

El problema de la contaminación global por COPs sigue vigente, debido a que la mayoría de ellos, provenientes de actividades humanas, aún siguen siendo liberados al medioambiente. Si bien el uso de ciertos compuestos ha sido prohibido en algunos países, todavía persisten niveles elevados de los mismos, con potencialidad para generar impactos severos en la salud de animales y humanos.

HEXACLOROBENCENO

- **Características generales**

El HCB es un fungicida que se introdujo por primera vez en 1945 para el tratamiento de semillas, fundamentalmente para la lucha contra las caries del trigo. Durante décadas (hasta el año 1965) ha sido producido industrialmente para dicho fin y otros, tales como la elaboración de fuegos artificiales y municiones y en la manufactura del caucho. Actualmente es liberado al

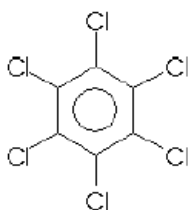
medio ambiente como producto secundario de la fabricación de productos químicos industriales polihalogenados como tetracloruro de carbono, percloroetileno, tricloroetileno, y pentaclorobenceno. Es asimismo una impureza de algunos otros pesticidas clorados (ATSDR, 2002).

El HCB es un compuesto muy insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos, con elevada volatilidad, resistente a la degradación y con un elevado coeficiente de reparto (Figura 1). Su vida media en la atmósfera es de 417 - 1250 días; en el agua persiste entre 3 y 4 años y en los suelos hasta 6 años.

Su utilización y producción industrial, ha sido prohibida en numerosos países como Alemania, Austria, Bélgica, Checoslovaquia, Dinamarca, Hungría, Liechtenstein, los Países Bajos, Panamá, el Reino Unido, Suiza, Turquía, Rusia y USA. En otros países como Argentina, Nueva Zelanda, Noruega y Suecia, está rigurosamente limitado o se ha retirado de manera voluntaria su utilización.

De todas formas, el HCB, está presente en todos los compartimentos del medio ambiente y su presencia ha sido determinada en alimentos de todo tipo. Científicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, detectaron la presencia de plaguicidas organoclorados en 50 muestras de leches maternizadas y 51 muestras de yogures y postres disponibles en el mercado, de consumo frecuente en la población infantil. Se detectó la presencia de HCB en el 9.9 % de dichas muestras, entre otros plaguicidas organoclorados (Diario Clarín, Marzo 2006).

HEXACLOROBENCENO (HCB)



Nombre químico: Hexaclorobenceno

Nombres comerciales (lista parcial): Amaticin, Anticarie, Buntcure, Bunt-no-more, Co-op hexa, Granox, No bunt, Sanocide, Smut-go, Sniecotox

CAS: 118-74-1; fórmula molecular: C_6Cl_6 ; peso molecular: 282 g/mol.

Aspecto: Cristales monoclinicos blancos o sólido cristalino.

Propiedades: Punto de fusión: 227-230°C; punto de ebullición: 323-326°C (se sublima); K_H : $7,1 \times 10^{-3}$ atm.m³/mol a 20°C; log Koc: 2,56-4,54; log Kow: 3,03-6,42; solubilidad en agua: 40 µg/l a 20°C; presión de vapor: $1,089 \times 10^{-5}$ mm Hg a 20°C.

Figura 1. Ficha técnica del HCB

- **Vías de absorción**

Las vías de absorción del HCB, son principalmente por inhalación de aerosoles y por ingestión de alimentos contaminados, como productos lácteos, peces y carnes. Además, puede ser absorbido por la inhalación de polvo contaminado (CHRIS, 1994).

Estudios con animales de investigación indican que la absorción de HCB por ingestión a través de la vía gastrointestinal es variable, dependiendo del solvente utilizado como vehículo para su administración. En vehículos acuosos la absorción es de alrededor de un 6 %, mientras que con vehículos aceitosos la absorción puede llegar hasta un 82 % (ATSDR, 1996; Courtney, 1979). El HCB es particularmente tóxico para el feto, y posteriormente para el neonato a través de la ingestión de leche materna (ATSDR, 1996). Un estudio realizado en el Hospital Materno Infantil Ramón Sardá de Buenos Aires, demostró la presencia de HCB en leche materna de puérperas que ingresaron al Servicio de Obstetricia del Hospital o que acudieron espontáneamente para su primer control al Consultorio de Puerperio hasta diez días después del parto. Se midió el nivel de numerosos plaguicidas organoclorados, entre ellos el HCB, en la leche de 189 puérperas, los resultados demostraron presencia de HCB en el 18,5 % de las muestras (Der Parsehian y Grandi, 2003).

La absorción dermal no es una vía de gran contaminación, aunque estudios en animales han demostrado absorción cutánea en ratas. Dado que la contaminación dermal puede también ser fuente de absorción, la higiene personal tiene profunda influencia en la carga corporal de HCB (Koizumi, 1991).

- **Distribución y Metabolismo**

Una vez absorbido, el HCB se distribuye en órganos y tejidos con alto contenido lipídico, aumentando su concentración con el correr de los años por bioacumulación. Es lentamente metabolizado a pentaclorofenol por el sistema hepático del citocromo P-450 (isoformas CYP3A1, CYP ·A2 y CYP ·A4) (den Besten et al., 1993), conjugado con glutation para dar pentaclorotiofenol, o dechlorinado reductivamente para formar pentaclorobenceno (Renner, 1988). El pentaclorofenol se convierte posteriormente en tetraclorohidroquinina (Mehmood et al., 1996). La eliminación del HCB del organismo, se produce por vía urinaria, mayoritariamente como metabolitos del mismo, siendo el pentaclorofenol y el pentaclorobenceno, los predominantes. En menor medida se encuentran metabolitos como el tetraclorobenceno, tetraclorofenoles, tetraclorohidroxiquinonas, y triclorofenol entre otros (ATSDR, 1996).

- **Efectos de la exposición al HCB**

Estudios efectuados en animales de experimentación han demostrado que la exposición oral al HCB, produce efectos nocivos en el hígado, la glándula tiroidea, los riñones y los sistemas inmune y endocrino. Los efectos hepáticos comprenden hepatomegalia, desarrollo de porfiria hepática (Mylchreest y Charbonneau, 1997) y la inducción de una amplia variedad de isoformas del citocromo P450, tanto aquellas inducibles por fenobarbital (CYP3A), como aquellas inducibles por 3-metilclolantreno (CYP1A1/2) (Linko et al. 1986; Li et al., 1989; Sinclair et al., 2000), CYP2B1, así como otras enzimas hepáticas hormonotiroideas-dependientes tales como, la enzima málica hepática (Kleiman de Pisarev et al., 1995; Loaiza et al., 1999).

Se demostró, además, que el HCB promueve el desarrollo de cáncer en múltiples órganos y tejidos, tales como hígado (Gustafson et al., 2000), y mama (Randi et al., 2006). También es un carcinógeno tiroideo en hamsters, ratas y ratones (Courtney, 1979; Cabral y Shubik, 1986; Smith et al., 1987; Li et al., 1989). Recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio que el HCB aumenta la migración celular de células de cáncer de mama de origen humano MDA-MB-231 (Pontillo et al., 2011).

El tratamiento de roedores con HCB produjo la disminución en los niveles de corticosterona y cortisol séricos (Foster et al., 1995) y disfunciones inmunológicas (Ezendam et al., 2004). Asimismo produce, en ciertos sistemas biológicos, alteraciones a nivel del sistema nervioso central (Sundlof et al., 1981) y a nivel del sistema reproductivo (Foster et al., 1992; Alvarez et al., 2000).

Las evidencias experimentales de los efectos endocrinos, que produce el HCB, son numerosas y comprenden alteraciones en la síntesis, metabolismo, distribución y depuración de numerosas hormonas. Los estudios sobre poblaciones humanas son dificultosos, dado que, a diferencia de los animales de laboratorio que son expuestos a un único evento o unos pocos eventos de un único tóxico, las poblaciones humanas pueden estar expuestas a numerosos tóxicos ambientales, durante toda su vida, en diferentes estadios del desarrollo, y en distintos niveles de exposición. Por otra parte, la susceptibilidad y sensibilidad a los efectos tóxicos dependerán del estadio de desarrollo. Así un adulto, un niño o un nonato, presentarán distintas sensibilidades y reactividades frente a un mismo tóxico en una misma dosis, determinando ventanas críticas de mayor susceptibilidad a los efectos deletéreos de un contaminante ambiental como el HCB.

A pesar de las limitaciones asociadas a los estudios en poblaciones humanas, los resultados arrojados por los estudios experimentales, representan una real potencialidad para inferir sus probables efectos sobre la salud humana.

El episodio más representativo en relación con los efectos del HCB sobre el ser humano, proviene de una intoxicación masiva que se produjo en la región oriental de Turquía entre 1954

y 1959, por la ingestión de harina elaborada con semillas de trigo tratadas con este producto. Entre 3.000 y 4.000 campesinos que consumieron dichas semillas desarrollaron porfiria hepática, lesiones cutáneas fotosensibles, hiperpigmentación, hirsutismo, hígado hipertrofiado, anorexia, artritis y pérdida de masa muscular esquelética. A pesar de que la mayoría de los adultos se recuperaron después de suspender el consumo de harina contaminada, numerosos infantes lactantes de madres afectadas murieron. A su vez se registró un aumento en la frecuencia de nacimientos de niños con fragilidad en la piel, trastornos neurológicos, corta estatura, extremidades pequeñas, y agrandamiento de la glándula tiroidea (Courtney, 1979; ATSDR, 1996).

La incidencia de bocio registrada en un estudio sobre 252 pacientes, 20 a 30 años después de la exposición, mostró que el 34,9% de los pacientes tenía un agrandamiento de la tiroides (Gocmen et al., 1989).

- **Efecto sobre la función tiroidea**

El HCB produce alteraciones en la homeostasis de las hormonas tiroideas. Se ha demostrado en nuestro y otros laboratorios, que el tratamiento de ratas con altas dosis de HCB (500-1000 mg/kg peso corporal), produce una disminución en los niveles séricos de L-3,3',5,5'-tetraiodotironina o tiroxina (T_4) tanto total como libre, sin afectar los niveles totales de L-3,5,3'-triiodotironina (T_3) (Kleiman de Pisarev et al., 1989, 1990, van Raaij et al., 1993a). A la mayor dosis, estos efectos fueron acompañados por un incremento compensatorio en los niveles séricos de la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH). Sin embargo la relación peso tiroideo/peso corporal no se modificó, ni aún después de 8 semanas de tratamiento (Kleiman de Pisarev et al., 1989, 1990; van Raaij et al., 1993a, 1993b; den Besten et al., 1993).

La hipotiroxinemia inducida por HCB, se atribuye a un aumento en el metabolismo de T_4 inducido por la UDP-glucuroniltransferasa de T_4 (T_4 -UDPGT) hepática (van Raaij et al., 1993b, Alvarez et al., 2005).

Por otra parte se reportó que metabolitos hidroxilados del HCB tales como el pentaclorofenol, disminuyen la unión de la T_4 con su transportador proteico en suero (den Besten et al., 1993; van Raaij et al., 1993a).

Un estudio realizado en los Estados Unidos en 2010, a jóvenes y adolescentes de la zona de Akwesasne (región ubicada entre Canadá y los Estados Unidos) demostró que la exposición crónica al HCB está asociada con alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas. Se observó una correlación negativa entre los niveles de HCB y los niveles de T_4 total, así como una significativa correlación positiva con los niveles de auto-anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea (TPOAb), un marcador de enfermedades autoinmunes de la tiroides, cuyo aumento puede producir una hipofuncionalidad de la glándula (Schell y Gallo, 2010).

- **Mecanismos de acción**

El HCB es considerado un tóxico tipo-dioxina, ya que muchos de los efectos que produce, son similares a los producidos por el 2,3,7,8, Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Smith et al., 1987; Li et al., 1989; van Birgelen, 1998), un éter aromático policlorado. El TCDD es un compuesto de muy alta toxicidad, cuyo mecanismo de acción está mediado por su interacción con el receptor citosólico de Hidrocarburos Aromáticos (AhR).

Se ha demostrado que el HCB se une a dicho receptor con una afinidad 10.000 veces menor que la del TCDD (Hahn et al., 1989). Sin embargo la evidencia acerca de que la toxicidad del HCB esté mediada por su interacción con dicho receptor no es concluyente. El HCB por ser un agonista débil, del AhR (Hahn et al., 1989), podría actuar sobre algunos parámetros celulares, por mecanismos independientes de este receptor, dependiendo del tiempo y la dosis de exposición.

Matsumura (1994) propuso que el TCDD, después de su ingreso a la célula a través de la membrana plasmática, se une al AhR que forma parte de un complejo junto con las proteínas de shock térmico (HSP) 90, 70, y 50, una pequeña proteína p23, una proteína quinasa de tirosina, celular Src (c-Src), y una inmunofilina (XAP2). Seguidamente, el dímero AhR-TCDD se separa del resto del complejo y se trasloca al núcleo, formando un heterodímero con la proteína traslocadora nuclear del AhR (ARNT). Este heterodímero modula la expresión de genes que poseen en sus promotores elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) o elementos de respuesta a Dioxinas (DRE) (Figura 2).

La acción más común de todos los químicos tipo-dioxinas 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 sobre CYP1A2. 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 o DRE, a la cual se une el complejo formado por ARNT y el AhR unido a su ligando, causando la activación de su expresión. Además, la inducción por la unión del ligando al AhR, controla una amplia batería de genes que codifican para otras enzimas encargadas de metabolizar xenobióticos, incluyendo la subunidad Ya de la enzima glutatión-S-transferasa (GSTA1, Ya), NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1), UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT) (Alvarez et al., 2005), y la enzima aldehído-3-deshidrogenasa 3 (ALDH3A1) entre otras (Nebert et al., 2000; Gu et al., 2000).

A través de los años, se ha visto que el AhR activa diferentes vías de señales de transducción, de manera paralela a la activación de las vías de detoxificación, aún en ausencia de estimulación por ligandos exógenos (Marlowe y Puga, 2005).

Se ha propuesto que cuando el AhR unido al ligando se separa del complejo multiproteico, se libera la proteína c-Src activándose su quinasa de tirosina (PTK). La activación de c-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 (Matsumura, 1994) (Figura 2). La PTK interna de la c-Src, también 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). De este modo, además de interferir en los procesos de detoxificación, los ligandos del AhR, como el TCDD, también afectan la expresión de un gran número de genes involucrados en la proliferación celular, tales como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), e interleuquina-1 β (IL-1 β), entre otros, y en el control de la progresión del ciclo celular, a través de p27 y jun-B (Hankinson, 1995, Sogaza y Fujii-Kuriyama, 1997, Matikainen et al., 2002). Estas alteraciones causan una amplia gama de perturbaciones tales como, arrestos en G₀/G₁ (Khan y Dipple, 2000), y en G₂/M del ciclo celular, acumulaciones en fase S, disminución en la capacidad de replicación del ADN, e inhibición de la proliferación celular (Puga et al., 2009), e inducción de la apoptosis. Estudios recientes han demostrado que el TCDD, a través de su unión al AhR, aumenta la expresión de Fas, una proteína de superficie con dominio de muerte conservado, en células tímicas T, y del ligando de Fas (Fas L) en células del estroma tímico (Camacho et al., 2005). Además la exposición tanto *in vivo* como *in vitro* de ovarios de ratones en estadios fetales, a distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) resulta en un aumento de la apoptosis de células germinales, mediado por un incremento en la expresión de la proteína pro-apoptótica, Bax. Estos efectos son prevenidos por un antagonista selectivo del AhR, α -Naftoflavona (ANF) (Matikainen et al., 2002).

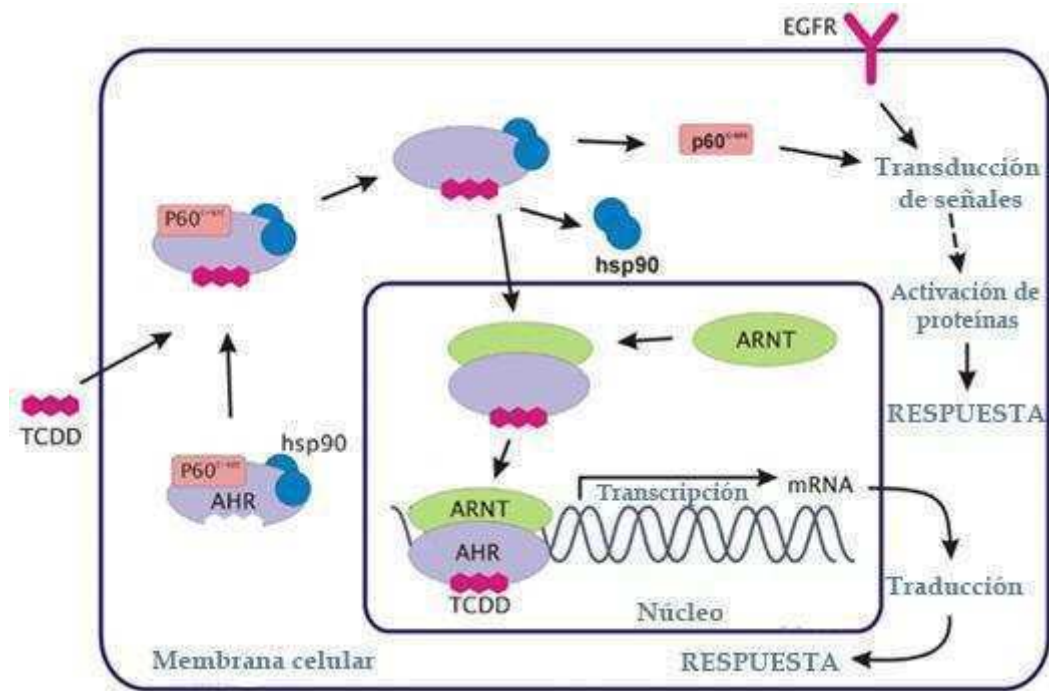
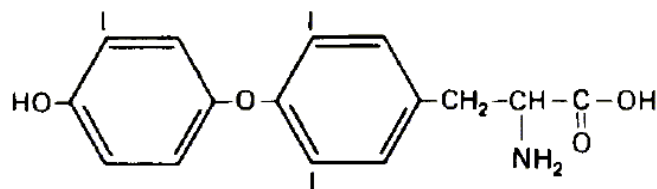


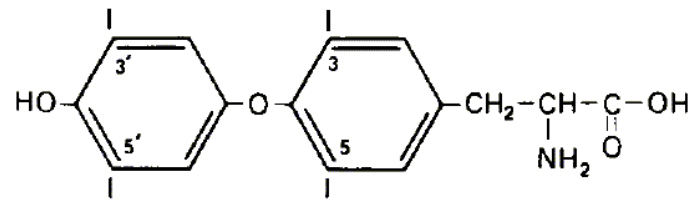
Figura 2. Mecanismo de acción del TCDD y tóxicos tipo dioxinas.

GLÁNDULA TIROIDES

La glándula tiroides es un órgano situado en la región anterior del cuello. Consta de dos lóbulos simétricos a los lados de la tráquea y la laringe que están unidos entre sí por un istmo. La función de la tiroides consiste en la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, tiroxina (T₄) y triiodotironina (T₃). Las hormonas tiroideas, son derivados iodados del aminoácido tirosina, poseen dos anillos aromáticos unidos por un enlace éter (Figura 3), lo que les da la característica de ser hormonas altamente hidrofóbicas. Las mismas cumplen un rol fundamental en numerosos procesos biológicos, que detallaremos más adelante.



3,5,3'-triiodotironina (T₃)



3,3',5,5'-tetraiodotironina o tiroxina (T₄)

Figura 3. Hormonas Tiroideas T₃ y T₄: Estructura molecular de las hormonas producidas por la glándula tiroides.

Desde el punto de vista histológico, la tiroides está constituida por folículos tiroideos de tamaño variable, rodeada de una pared de células epiteliales cúbicas, con una cavidad interna llena de coloide. La principal proteína almacenada en el coloide es la glicoproteína tiroglobulina (TG), molécula que va a almacenar a las hormonas tiroideas hasta su secreción al torrente sanguíneo. Entre los folículos tiroideos se sitúan las células c o parafoliculares, cuya función es la secreción de la hormona calcitonina, que participa en el metabolismo del calcio y del fósforo.

La regulación de la función tiroidea está dada por el eje hipotálamo/hipofisario, a través de la hormona hipotalámica liberadora de tirotrófina (TRH) y la hormona hipofisaria estimulante de la tiroides (TSH) (Figura 4). La TSH modulada por la TRH, produce su acción a través de su unión con el receptor específico ubicado en la membrana del tirocito, estimulando la captación de iodo, síntesis, iodación, endocitosis y proteólisis de la TG, y finalmente la secreción de las hormonas tiroideas a la circulación.

Las hormonas tiroideas viajan en la circulación unidas a proteínas de transporte, como la globulina que une preferentemente a la Tiroxina (TBG), la transtiretina y la albumina, hasta llegar a los órganos blanco donde van a disparar los distintos efectos biológicos.

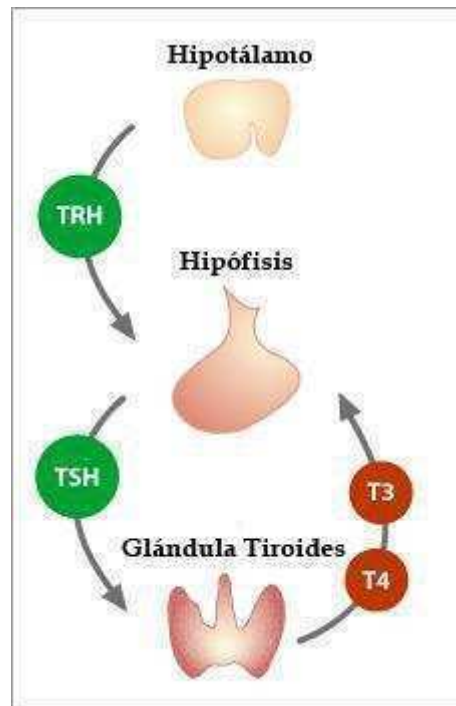


Figura 4. Eje Hipotálamo/Hipofisario

- **Efectos de las hormonas tiroideas**

Los efectos de las hormonas tiroideas se extienden prácticamente a la mayoría de los órganos y tejidos del organismo; interviniendo en procesos morfogénicos, sobre el crecimiento y diferenciación celular y regulando numerosos procesos metabólicos.

- *Efectos sobre el sistema nervioso central*

Las células nerviosas, son células blanco de las hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso. Durante el desarrollo embrionario dichas hormonas, inicialmente de procedencia materna, intervienen en el desarrollo del tallo cerebral, y en la migración y maduración neuronal. A partir de aproximadamente la semana 20 de gestación, la tiroides fetal es funcionalmente activa y la producción normal de hormonas tiroideas fetales es indispensable para el normal desarrollo cerebral. Después del nacimiento, las hormonas tiroideas intervienen activamente en procesos como la mielinización, formación de la glía y desarrollo de las sinapsis interneuronales.

- *Efectos sobre el crecimiento*

Las hormonas tiroideas actúan sobre el crecimiento, mediante dos mecanismos principales: a) estimulando la síntesis de hormona de crecimiento por la adenohipófisis, y b) estimulando la proliferación y diferenciación osteoblástica en coordinación con otras hormonas, a través de la acción del TGF- β , prostaglandinas y citoquinas.

- ***Acción sobre la termogénesis***

La acción de las hormonas tiroideas sobre la termogénesis depende fundamentalmente de la estimulación de la ATPasa de membrana. Esta enzima, regula el transporte de iones intracelulares, manteniendo de esta manera el gradiente iónico normal fuera y dentro de la célula. La energía para la acción de esta enzima proviene de la hidrólisis de ATP en ADP, proceso en el cual se desprende calor. Las hormonas tiroideas estimulan la actividad de la ATPasa lo que conlleva a una mayor utilización de ATP, y secundariamente a un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial.

- ***Efectos sobre el metabolismo***

Las hormonas tiroideas intervienen directamente en el metabolismo de hidratos de carbono, estimulando la gluconeogénesis, glucogenolisis, y glucólisis hepática. También producen un aumento en la absorción intestinal de glucosa y galactosa, y en la captación periférica de la glucosa por el tejido graso y muscular, potenciando en ellos el efecto de la insulina.

A nivel lipídico estimulan la síntesis hepática de ácidos grasos y de triglicéridos, como resultado de la mayor movilización y disposición de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo. Además, disminuyen la concentración de colesterol en plasma, debido a una mayor conversión en ácidos biliares y a un aumento proporcional de su metabolización por una mayor actividad de la enzima lipoprotein lipasa y un aumento del número de receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

- ***Efectos sobre el sistema nervioso simpático***

Las hormonas tiroideas aumentan el número de receptores β -adrenérgicos en tejidos como miocardio, músculo esquelético, tejido adiposo y tejido linfocitario, produciendo un aumento en la sensibilidad de los mismos a las catecolaminas.

- **Regulación del crecimiento de la glándula tiroides**

La glándula tiroides, de los mamíferos adultos, responde a estimulaciones crónicas con un aumento en la función e hipertrofia de las células foliculares, y bajo ciertas condiciones, con un incremento en la proliferación celular, es decir con hiperplasia. Los mecanismos involucrados en la regulación del cambio entre la hipertrofia y la hiperplasia no han sido todavía claramente explicados.

Existen evidencias experimentales que postulan a la TSH, como el principal regulador tanto de las funciones tiroideas específicas como del crecimiento de la glándula (Dumont et al., 1991; Lewinsky et al., 1993b).

Sin embargo, *in vitro* numerosos grupos de investigación no pudieron demostrar un efecto mitogénico directo de la TSH sobre células foliculares diferenciadas, demostrando de esta

manera la intervención en dicho proceso de otros factores de crecimiento (Kraiem et al., 1990; Gärtner, 1992). Algunos de ellos son sintetizados por las mismas células foliculares, actuando a través de una vía paracrina y autocrina. Otros en cambio, se desconoce si son producidos por la propia glándula, pero se sabe que actúan sobre ella, dado que se han encontrado receptores específicos para estas moléculas en la tiroides.

Entre los factores producidos por las células foliculares, se encuentran el factor de crecimiento insulino similar-1 (IGF-1) y algunas de las proteínas ligadoras de IGF-1 (IGF1-BP), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), TGF- β 1 y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Si bien otros factores tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), se encuentran involucrados en la regulación del crecimiento tiroideo, no se ha demostrado aún su síntesis en las células del epitelio folicular tiroideo (Pisarev, 2005).

TGF- β 1

El TGF β -1 es integrante de una gran familia de citoquinas la cuales regulan una amplia variedad de procesos celulares tales como, proliferación, diferenciación, migración, adhesión y muerte celular programada entre otros. La familia TGF- β comprende, en mamíferos, tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2, y TGF- β 3, siendo la isoforma TGF- β 1 la más estudiada. Cada isoforma es codificada por un gen diferente y se expresa de modo tejido-dependiente. Los efectos de TGF- β en el control del crecimiento celular son variados, y se modifican dependiendo del tipo y densidad celular, y de la presencia de otros factores de crecimiento (Pasche, 2001).

El TGF- β 1 genera diversas respuestas celulares a través de su interacción con proteínas específicas presentes en la membrana de la célula blanco. Han sido identificados numerosos receptores los cuales se agrupan en receptores de tipo I, II y III (T β RI, T β RII y T β RIII). Los T β RI [también llamados Activin-receptor like Kinasa (ALK)] y T β RII, son receptores de tipo treonina / serina quinasas y son esenciales para transmitir la señal de TGF- β 1 y producir las respuestas biológicas específicas. El T β RIII (betaglicano) es un proteoglicano que funciona como un ancla de membrana y está involucrado en la captura y presentación del TGF- β , a los T β RI y T β RII, encargados de transmitir la señal al interior de la célula (Massaous y Hata, 1997).

Al unirse TGF- β 1 a sus receptores T β RI y T β RII se forma un complejo heterotetramérico, formado por dos pares de subunidades de los receptores tipo I y tipo II. Una vez formado el complejo, el T β RII fosforila en residuos de serina y treonina al T β RI en una zona de 30 aminoácidos denominada región GS, la cual representa el dominio regulador y activa una quinasa del T β RI, permitiendo que se propague, de esta manera, la señal. El cambio en el patrón de fosforilación en la región GS del T β RI, sirve como un sitio de anclaje para proteínas de la familia de factores de transcripción SMAD (Schuster y Krieglestein, 2002).

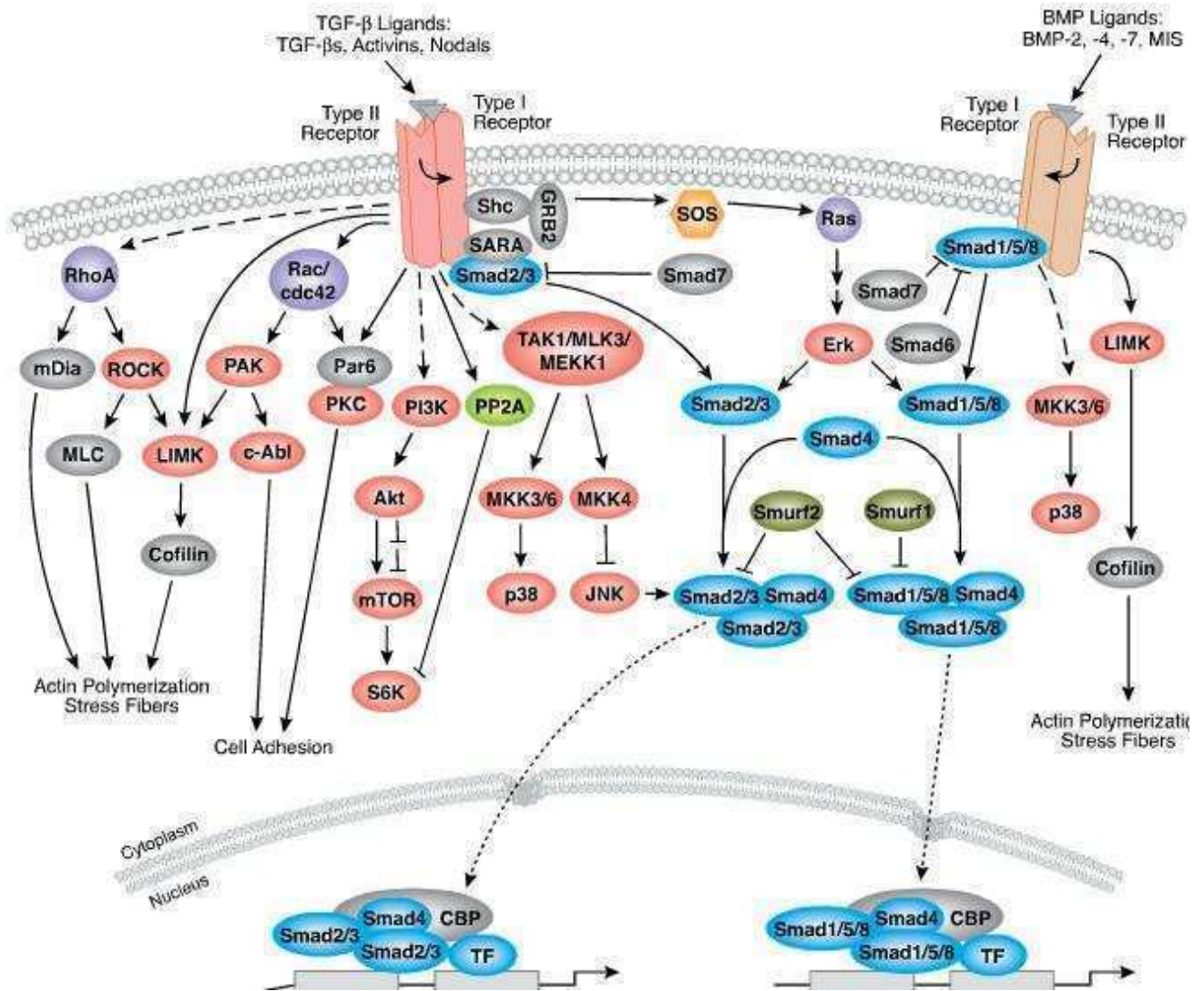
El T β RI activado promueve la fosforilación de las proteínas SMAD 2 y SMAD 3 (Figura 5). Una vez fosforiladas dichas proteínas forman un heterooligomero con la proteína co-SMAD 4 traslocándose al núcleo donde funcionan como activadores transcripcionales. Existen otras proteínas SMAD, como SMAD 6 y 7 que actúan como inhibidores interfiriendo con la activación de SMAD 2 y 3. La activación transcripcional por SMADS, mediada por interacciones físicas y cooperatividad funcional con factores de transcripción permite el crosstalk con otros caminos de transducción de señales (Figura 5).

Un segundo camino, independiente de SMADs, es la estimulación de IP3K y un aumento en la actividad del camino de señalización PI3K-Akt el cual actúa estimulando la proliferación celular (Figura 5). Un tercer camino, también independiente de SMADs, incluye la activación de Ras, que estimula la MAPKK, activando JNK por fosforilación y se lo ha relacionado con la acción pro-apoptótica de TGF- β 1 (Massague y Chen, 2000) (Figura 5). Existen numerosas proteínas activadas durante la señalización de TGF- β 1 independiente de las proteínas SMAD, que median un amplio rango de efectos cuyos resultados son a menudo dependientes del tipo y contexto celular (Mulder, 2000; Derynck y Zhang, 2003; Moustakas y Heldin, 2005). La señalización vía proteínas SMAD ocurre en la mayoría de los tipos celulares y ha sido bien caracterizada, sin embargo las vías independiente de SMADs frecuentemente varían en los distintos tipos celulares, de manera que han sido blanco de numerosa investigación en los últimos años.

En células epiteliales normales, el TGF- β 1 tiene una acción antiproliferativa y pro-apoptótica. En células tumorales se pierde esta respuesta y el TGF- β 1 puede estimular la proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis (Bierie y Moses, 2006; Stover et al., 2007).

El TGF- β 1 actúa modificando los niveles de proteínas regulatorias del ciclo celular tales como la ciclina D, ciclina E y CDK4 o mediante la acción de inhibidores de los complejos de ciclinas-cdks tales como p27, p15 o p21 (Saltis, 1996; Iavarone y Massagué, 1997). Estos mecanismos dependen del estado proliferativo de cada tipo celular específicamente. En algunos tipos de células el arresto celular inducido por el TGF- β 1, está acompañado por la inducción de apoptosis. En etapas tardías de la progresión tumoral, las células tumorales se vuelven resistentes al efecto inhibitorio del TGF- β 1 sobre el crecimiento, a través de mecanismos que involucran la pérdida o alteraciones de las vías de señalización de sus receptores (Seoane, 2006). En ese caso el TGF- β 1, se vuelve un factor oncogénico induciendo la invasión, angiogénesis, la transición epitelio mesenquimal (EMT), la proliferación celular y la metástasis (Derynck et al., 2001; Wakefield y Roberts, 2002; Pardali y Moustakas, 2007).

TGF-β Signaling



Extraído: Cell Signaling Pathways

Figura 5. Vías de señalización de TGF-β1

- TGF-β1 y tiroides

El factor TGF-β1, es sintetizado en las células foliculares tiroideas y funciona como un potente inhibidor de la proliferación celular y de las funciones diferenciadas tiroideas, tales como la captación de yoduro y la biosíntesis hormonal. Asimismo, el TGF-β1 también está involucrado en la inducción de muerte celular programada o apoptosis (Oberhammer et al., 1993). Estudios *in vitro* en células foliculares tiroideas porcinas demostraron que el TGF-β1 induce apoptosis (Froschl et al., 1994), y estudios en líneas celulares humanas de carcinoma medular de tiroides mostraron que el tratamiento con TGF-β1 disminuye la proliferación celular

y produce un incremento en el índice de células apoptóticas (Khosla et al., 1994). Sumado a esto, se ha demostrado que células foliculares tiroideas normales en cultivo resultan inhibidas por TGF- β 1, quedando retrasadas en fase G₁ del ciclo celular (Cirafici et al., 1992). El arresto del ciclo celular en la interfase G₁ se ha relacionado a la acción de TGF- β 1 sobre factores que inhiben a las quinasas de ciclinas. Estudios realizados en ratas, a las que se les indujo una hiperplasia de células foliculares, por deficiencia de yodo, o debido al tratamiento con un bociógeno, demostraron un aumento en los niveles de expresión de TGF- β 1, y un arresto en el crecimiento de la glándula luego de 4 semanas de inducción del bocio. Estos datos reflejan un rol crítico de este factor en un mecanismo de balance que pretende frenar la proliferación exagerada.

Sin embargo, estudios realizados en cultivo, con líneas celulares transformadas, demostraron una respuesta de dichas células al TGF- β 1 alterada, mostrándose resistentes al efecto inhibitorio (Coppa et al., 1997). Finalmente se ha observado que la sensibilidad a la acción inhibitoria de TGF- β 1, disminuye a medida que aumenta la indiferenciación de células transformadas tiroideas.

APOPTOSIS

En los años 80 se introduce el término griego de apoptosis que significa “caída de las hojas de un árbol o los pétalos de una flor” (APO: separar, PTOSIS: caer) (Wyllie et al., 1980), para definir las características morfológicas particulares de un tipo de muerte celular fisiológica, programada genéticamente, que difiere de la muerte celular patológica o necrosis celular. Ya en sus publicaciones en 1972 Kerr, Wyllie y Currie distinguen entre células que mueren de una manera ordenada de aquellas que lo hacen en forma catastrófica (necrosis) y describen una serie de eventos morfológicos que sufren las células como consecuencia de una amplia variedad de estímulos.

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de muerte celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario entre otros procesos. Es un proceso de muerte celular activo y definido que juega un rol importante en el desarrollo de organismos multicelulares y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos bajo condiciones fisiológicas y patológicas. De este modo, las células crecen de manera controlada gracias a la expresión de nuevos genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados (Ellis et al., 1991, Martín, 1993). Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie o sobre proteínas citoplasmáticas y causar la activación en cascada de las distintas vías apoptóticas, lo que

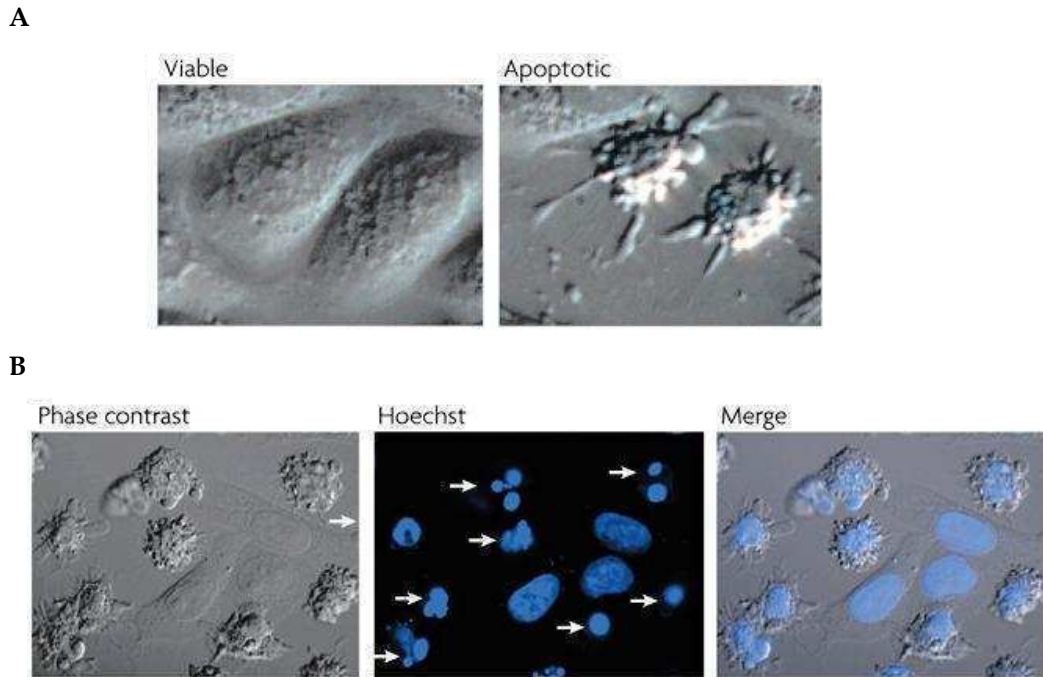
produce como resultado la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la fragmentación del material genético por acción de endonucleasas (Silvestri et al., 1995).

- **Características morfológicas de las células apoptóticas**

Las características morfológicas de una célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. En este último fenómeno la muerte es un proceso pasivo, es decir sin requerimiento de gasto energético a través de la síntesis de proteínas específicas que regulan el proceso. La muerte se produce por pérdida de la homeostasis celular y la célula necrótica se caracteriza por un tamaño incrementado, organelas desorganizadas, las mitocondrias se hinchan mientras que la membrana interna mitocondrial se contrae, la cromatina aparece dispersa y finalmente la membrana celular se rompe volcando su contenido al medio extracelular (Raff, 1992), produciéndose una respuesta inmune del tipo inflamatoria.

La apoptosis, sin embargo, es un proceso activo, que requiere de síntesis proteica, y por consiguiente se produce gasto energético. La célula experimenta una reducción de su volumen y pierde el contacto con las células vecinas. Si bien las organelas intracelulares permanecen intactas, las cisternas del retículo endoplásmico liso se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática. La fosfatidilserina, presente en la cara interna de la membrana plasmática se expone en el exterior de la misma, permitiendo su reconocimiento por los macrófagos, para su fagocitosis. El núcleo celular sufre cambios dramáticos, como la acumulación de la cromatina condensada en la periferia nuclear, la desintegración del nucléolo y la fragmentación del ADN en fragmentos oligonucleosomales. Debido a ello se produce el clásico patrón en escalera cuando se analiza por electroforesis el contenido de ADN de células apoptóticas. La membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. La fragmentación del ADN, ocurre durante el proceso final de la apoptosis, y como resultado de las grandes invaginaciones de la membrana aparecen los llamados **cuerpos apoptóticos**, formados por los elementos deteriorados del núcleo y el citoplasma (Figura 6). Los restos de una célula apoptótica son reconocidos y fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Wyllie et al., 1984).

De todas formas en los últimos años este paradigma apoptosis-necrosis, como procesos de muerte regulado y accidental respectivamente, ha sido fuertemente cuestionado y actualmente existen en la literatura reportes que describen vías moleculares con morfología necrótica, que pueden ser inhibidas, estableciendo la existencia de elementos regulables, codificados genéticamente, durante la necrosis.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 6. Características morfológicas de las células apoptóticas: (A) Contraste de fases de células viables y apoptóticas, **(B)** Contraste de fases y tinción con Hoechst de células viables y apoptóticas. Las células apoptóticas se encuentran señaladas con flechas.

- **Mecanismos de Apoptosis**

El mecanismo de la apoptosis es extremadamente complejo y sofisticado, de manera que múltiples moléculas promueven la muerte celular, amplificando el estímulo a través de efectos en cascada y loops de retroalimentación positiva, asegurando que una vez iniciado el proceso apoptótico, el camino a la muerte sea rápido e irreversible.

Vías de señalización:

- 1) Vía extrínseca que involucra receptores de membrana.
- 2) Vía intrínseca, disparada por estrés intracelular, e involucra la mitocondria.
- 3) Vías mediadas por otros orgánulos celulares: retículo endoplasmático y lisosomas.

1) La vía de señalización apoptótica extrínseca, es mediada por receptores de membrana, llamados de manera genérica, **receptores de muerte**, pertenecientes a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral α (TNF α). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95, también denominado Fas o Apo-1 y los TNFR-I y II, también denominados p55 o DC120a. Dichos receptores presentan un dominio de muerte intracelular y un dominio extracelular rico en cisteínas. Los ligandos que activan estos receptores están

estructuralmente relacionados con moléculas pertenecientes a la superfamilia de receptores TNF. El ligando de CD95 (CD95L o FasL) se une al receptor CD95 (Suda et al., 1993), y el TNF se unen a TNFR-I (Figura 7).

CD95

CD95 y CD95L desempeñan un rol importante principalmente en tres tipos de apoptosis fisiológica: a) supresión periférica de células T maduras al final de una respuesta inmune, b) muerte de células blanco, como células infectadas por virus y tumorales, mediada por el sistema inmune como linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y natural killers y c) muerte de células inflamatorias en sitios inmunoprivilegiados.

Igual que otros miembros de la superfamilia de receptores TNF, el CD95L es una molécula homotrimérica, que actúa como ligando de CD95 y produce su oligomerización, formando trímeros de receptores. Esto provoca el reclutamiento de proteínas adaptadoras a los dominios de muerte ubicados en el dominio intracelular del receptor.

La proteína adaptadora de CD95 es llamada **FADD** (Fas Associated Death Domain), la cual se une mediante su propio dominio de muerte al agrupamiento de receptores. Los FADD también presentan un “dominio efector de muerte”, el cual se une a un dominio análogo repetido en tándem dentro de la forma zimogénica de la **Caspasa-8** (Cystein-containing Aspartate-specific proteasa 8). Las caspasas son proteasas que juegan un papel clave en el proceso de apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998). La familia de las caspasas está constituida por más de doce proteasas caracterizadas por la presencia de residuos de cisteína en su sitio activo. Estas proteínas están ampliamente conservadas evolutivamente y comparten secuencias estructurales comunes (Wolf y Green, 1999). Las mismas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por ruptura proteolítica, produciendo la hidrólisis en residuos de ácido aspártico de la proteína sustrato. Así, la activación inicial de una caspasa provoca una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas. Aunque la familia de las caspasas comparte una estructura común, los análisis filogenéticos han demostrado la existencia de subfamilias que presentan diferentes características y que por lo tanto tienen distintos roles en el proceso de apoptosis (Lincz, 1998; Wolf y Green, 1999). Así, las *caspsas iniciadoras* (Caspasas 2, 8, 9, 10) presentan pro-dominios funcionales que permiten la asociación de estas moléculas con complejos de señalización; las *caspsas ejecutoras o efectoras* (Caspasas 3, 6, 7) son activadas por las caspasas iniciadoras y son las responsables de la interacción con otras moléculas que desencadenan la apoptosis. La tercera subfamilia de caspasas es la de las *caspsas procesadoras de citoquinas o caspasas involucradas en la inflamación* (caspsas 1, 4, 5, 12, 13, 14).

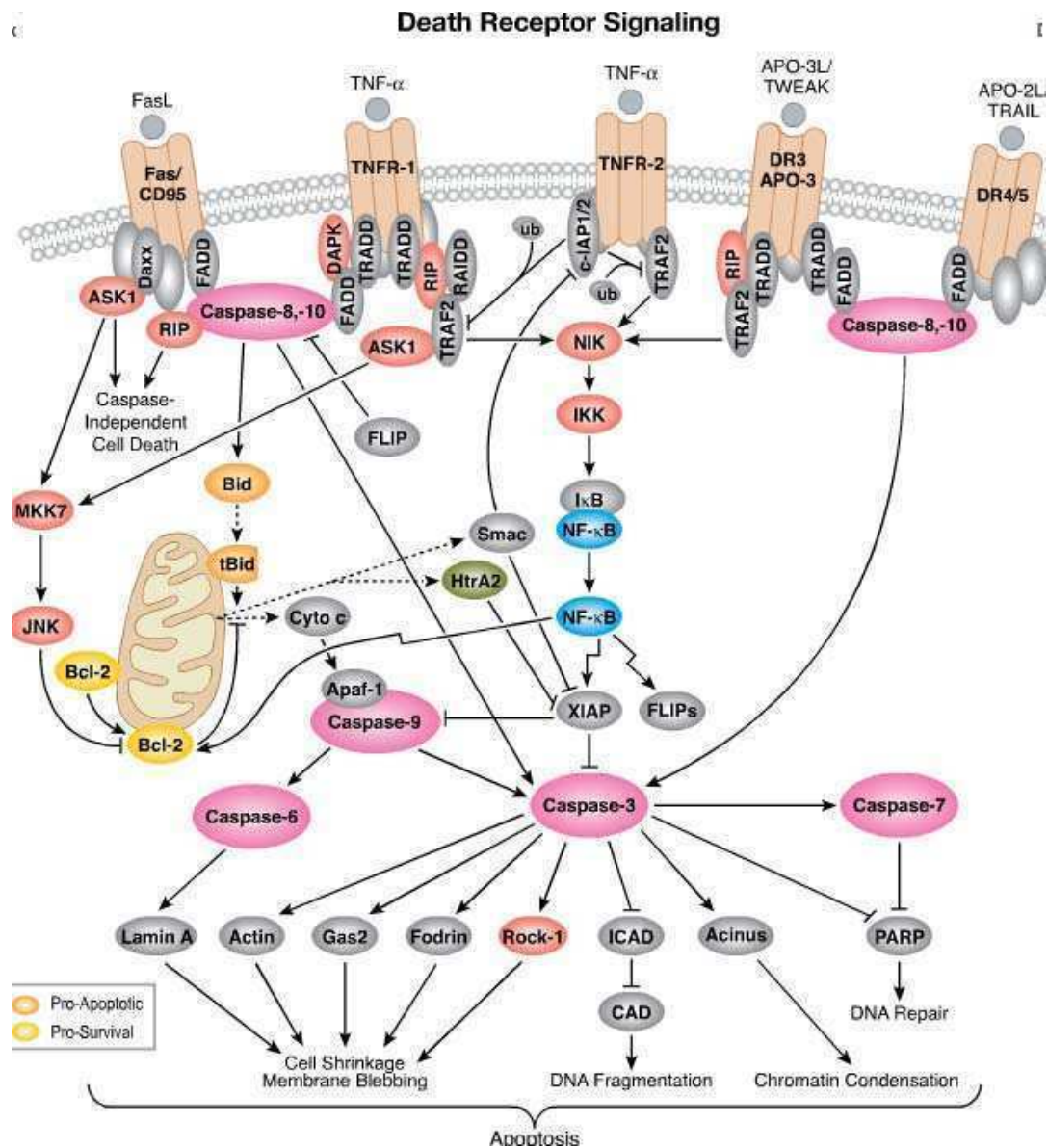
Existen numerosos sustratos de caspasas, entre los que se destacan elementos del citoesqueleto (Thornberry y Lazebnik, 1998), enzimas encargadas de reparar el ADN (Kaufmann et al., 1993), o degradarlo (Hacker, 2000), factores involucrados en la destrucción de la lámina nuclear (Duband-Goulet et al., 1998), factores de transcripción y proteínas reguladoras de quinasas y fosfatasas, entre otros.

Bajo el reclutamiento mediado por FADD, se produce la oligomerización de la caspasa-8, hecho que conduce a su activación por auto-proteólisis. La caspasa-8 activa, puede inducir la apoptosis en forma directa mediante la activación de la caspasa-3 o indirectamente a través del clivaje del factor citosólico Bid, conduciendo a la activación de la vía mitocondrial.

TNFR-I

El TNF es producido principalmente por macrófagos activados y células T en respuesta a las infecciones. Por medio de TNFR-I, el TNF activa los factores de transcripción NFκB y AP-1, llevando a la inducción de genes pro-inflamatorios e inmuno-inflamatorios. En algunos tipos celulares, el TNF también induce apoptosis a través de TNFR-II.

El TNF trimeriza los TNFR-I, induciendo de esta manera, la asociación de los dominios de muerte de los receptores. Subsecuentemente un adaptador denominado **TRADD** (TNFR-Associated Death Domain) se une a través de su propio dominio de muerte a los receptores de muerte agrupados. Los TRADD funcionan como una plataforma de reclutamiento al receptor activado, para varias moléculas de señalización: TNFR-associated factor-2 (**TRAF-2**) y la proteína de interacción con el receptor (**RIP**) estimulando el patrón de activación del NFκB y el JNK/AP-1. El adaptador FADD acoplado al complejo TNFR1-TRADD actúa activando caspasas, e iniciando la apoptosis.



Extraído: Cell Signaling Pathways

Figura 7. APOPTOSIS. Vía extrínseca o de Receptores de Muerte.

2) La Vía intrínseca de apoptosis, que involucra la mitocondria, es desencadenada por señales de estrés intracelular, como la generación de **especies reactivas de oxígeno (ROS)**, aumento de las concentraciones de Ca^{++} , privación de factores tróficos, y daño en el ADN entre otros. Estas señales desencadenan la vía mitocondrial, produciendo, como consecuencia, un desacoplamiento de la cadena respiratoria, colapso del potencial transmembrana mitocondrial, liberación de proteínas mitocondriales que funcionan como factores apoptogénicos, tales como el **citocromo c**, AIF (Factor Inductor de Apoptosis), **Smac/Diablo**, **HtrA2/Omi**, **endonucleasa G** (EndoG), e hipergeneración de aniones superóxido. El citocromo c unido a Apaf-1 activa a la caspasa-9, la cual a su vez, cliva y activa a caspasas efectoras tales como caspasa-3, -6 y -7,

llevando a los pasos finales de la apoptosis. Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 promueven la actividad de las caspasas, uniéndose y antagonizando a las proteínas inhibidoras de caspasas (IAPs). El AIF y EndoG, se translocan del espacio intermembrana al núcleo, donde están involucrados en la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina. Está en cuestionamiento, si estas proteínas son liberadas conjuntamente durante la apoptosis (Figura 8).

El AIF es una flavoproteína anclada en la membrana mitocondrial interna de 62 KDa. Bajo condiciones fisiológicas, dicha proteína, presenta actividades de NADH oxigenasa y monodehidroascorbato reductasa cumpliendo, un rol importante en la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa (Miramar et al., 2001). Sin embargo, durante la muerte celular por apoptosis es procesada a su forma madura de 57 KDa, y liberada desde la mitocondria hacia el citosol, para luego traslocar al núcleo, donde participa de la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en fragmentos de alto peso molecular (50 Kpb). El mecanismo por el cual AIF es procesado, no se conoce claramente, pero ha sido blanco de numerosos estudios en los últimos años. Se ha reportado que para su liberación de la mitocondria, el AIF debe ser clivado y removida la porción N-terminal que lo mantiene anclado a la membrana (Otera et al., 2005). Dicho clivaje puede ser catalizado por Calpaínas Ca^{++} dependientes y Catepsinas B, L y S, Ca^{++} independientes (Polster et al., 2005; Yuste et al., 2005).

El procesamiento del AIF está regulado secuencialmente por Ca^{2+} y por ROS. La elevación del Ca^{2+} intracelular tiene al menos dos efectos, primero la activación de la calpaína mitocondrial ubicada en el espacio intermembrana y segundo, el aumento de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, lo que estimula la producción de ROS. Este hecho conduce a la modificación oxidativa (carbonilación) del AIF, lo que presumiblemente está asociado con una mayor accesibilidad de la calpaína al sitio catalítico (Norberg et al., 2010a y 2010b). Existen estudios que demuestran que los compuestos antioxidantes pueden suprimir la muerte celular mediada por AIF en neuronas y en células de cáncer de varios orígenes, como de páncreas y de mama (Zhang et al., 2008; Chen y Wong, 2008).

En la vía mitocondrial de apoptosis, se encuentran involucradas proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células durante el proceso apoptótico, la cual incluye miembros tanto pro como anti-apoptóticos. El gen **bcl-2** (proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B) fue el primer proto-oncogen detectado y fue asociado con procesos malignos en las células B. Un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, induce la inhibición de la apoptosis en células B y produce como resultado la supervivencia de la célula transformada (Reap et al., 1995).

Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por proteínas tales como: Bcl-2, Bax (Bcl-2 associated X protein), Bad, Bid, Bcl-XL, Bcl-Xs, Mcl-1, entre otras. El destino de una célula de morir o sobrevivir estará determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas,

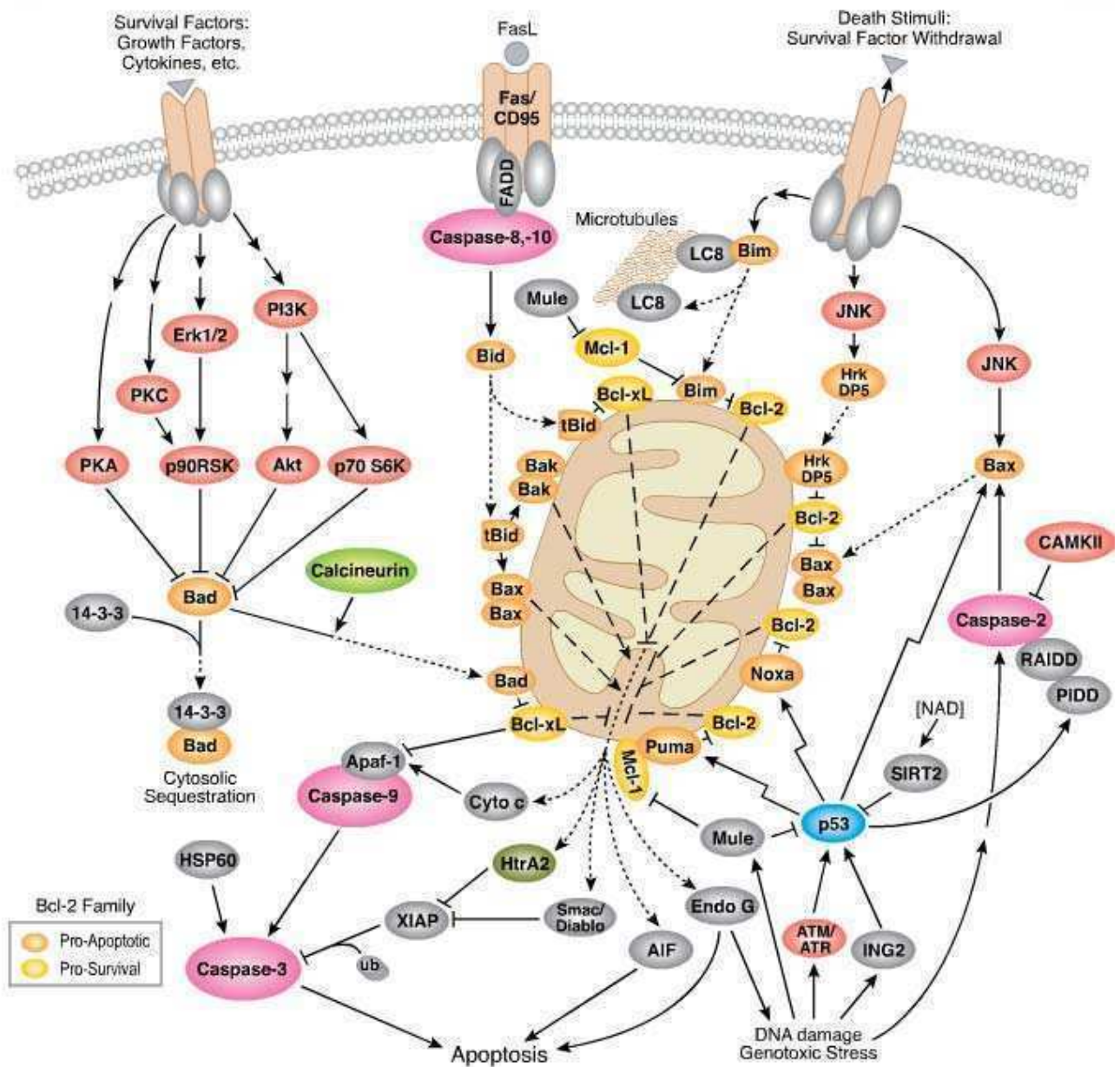
actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise et al., 1993 y 1995) (Tabla 1).

El citocromo *c*, es una pequeña hemoproteína, abundantemente encontrada en el espacio intermembrana de la mitocondria, que posee dos funciones biológica principales: a) interviene en la respiración celular, transportando electrones de la citocromo *c* reductasa (complejo bc1), hacia la citocromo *c* oxidasa (Pinheiro et al., 2003), y b) participa en la activación de la vía apoptótica mitocondrial una vez liberado (Schug y Gottlieb, 2009). Dicha proteína, se encuentra predominantemente unida a la membrana interna mitocondrial a través de un fosfolípido de membrana denominado cardiolipina (CL). Dicha unión es indispensable para retención, estabilidad y normal funcionamiento del citocromo *c*. La peroxidación de la CL se correlaciona con una menor capacidad de la misma para retener al citocromo *c* en membrana y a un aumento en la liberación del mismo y subsecuente apoptosis (Kriska et al., 2005)

Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial; sin embargo, algunos estímulos provocan la liberación del mismo al citosol, lo que es acompañado por la pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo *c* se une a la proteína **Apaf-1**, formando un complejo junto con otras proteínas llamado **apoptosoma**, lo que lleva al reclutamiento y activación de pro-caspasa-9, la cual puede, a su vez, activar otras caspasas (Kroemer et al., 1998). Algunos miembros de la familia Bcl-2, como el propio Bcl-2 y Bcl-Xl se encuentran en la membrana externa de la mitocondria e inhiben la liberación de citocromo *c*, siendo por lo tanto proteínas anti-apoptóticas. El efecto anti-apoptótico de Bcl-2 implica el bloqueo de Bax y la inhibición de la liberación de citocromo *c* desde la mitocondria (Jacobson y Raff, 1995). Algunos autores han sugerido que Bcl-Xl puede inhibir la apoptosis mediante la interacción con Apaf-1, lo que bloquea la formación del complejo Apaf-1/pro-caspasa-9 (Hu et al., 1998).

Otros miembros de la familia Bcl-2 como Bcl-Xs, Bad, Bid y Bax actúan promoviendo la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria. Estos miembros que inducen daño en la mitocondria residen en el citosol y se translocan a la mitocondria ante estímulos apropiados.

Mitochondrial Control of Apoptosis



Extraído: Cell Signaling Pathways

Figura 8. APOPTOSIS. Vía intrínseca, mitocondrial.

| PRO - APOPTÓTICAS | | ANTI - APOPTÓTICAS |
|-------------------|-----------|--------------------|
| Bax | Noxa | Bcl-2 |
| Bcl-Xs | Puma | Bcl-Xl |
| Bad | Bcl - GS | Bcl-W |
| Bak | Bcl - GL | Bcl-B |
| Bok | MAP - 1 | Bag-1 |
| Bid | Bcl-rambo | A1/ Bf I-1 |
| Bik | Bmf | Mcl - 1 |
| Bim | BRCL2 | BRAG - 1 |
| Hrk/ DP5 | Blk | NR - 13 |
| | | BHRF - 1 |
| Nix/ Bnip3L | | Diva |

Tabla 1: Proteínas PRO y ANTI- apoptóticas de la familia de Bcl-2.

3) La apoptosis puede también estar mediada por otros orgánulos celulares tales como el retículo endoplasmático y los lisosomas. Se ha demostrado que el estrés del retículo endoplasmático, producido por alteración en la homeostasis de calcio o la acumulación de proteínas, conduce a la activación de la caspasa-12 (Nakagawa et al., 2000), desencadenándose de esta manera la apoptosis. Además, la liberación de catepsinas (proteasas lisosomales) desde los lisosomas al citosol, induce apoptosis mediante un aumento de la permeabilidad mitocondrial, y activación de caspasas.

- **Apoptosis con morfología celular diferente.**
- ✓ **Apoptosis-like programmed cell death (PCD):** Esta muerte celular programada se caracteriza por condensación de la cromatina de manera menos compacta y completa, con forma abultada. Existen también moléculas de reconocimiento para fagocitosis. Se trata de una muerte mayormente independiente de caspasas, disparada principalmente por catepsinas, calpaínas y AIF.
- ✓ **Necrosis-like programmed cell death (PCD):** Esta muerte celular programada se caracteriza por ausencia de condensación de la cromatina o presencia de una condensación punteada. Puede ocurrir con externalización de fosfatidil serina (PS), y es una muerte independiente de caspasas. Dentro de este tipo de muerte celular encontramos un subgrupo, denominado **apoptosis abortada**. En este tipo de muerte el proceso apoptótico se ve interrumpido por inhibición de caspasas, y la muerte finalmente progresa por mecanismos independientes de caspasas.

DINÁMICA MITOCONDRIAL

Las mitocondrias (del griego mitos: hilo, kóndros: gránulos) son organelas citoplasmáticas, esenciales para la vida de las células, cuya función principal es proporcionar energía a través de la producción de ATP. Estudios de microscopía electrónica han conducido a revelar la ultraestructura característica de las mitocondrias, formadas por una membrana externa, una membrana interna, un espacio definido entre estas dos membranas, el espacio intermembrana, y una matriz mitocondrial (Figura 9).

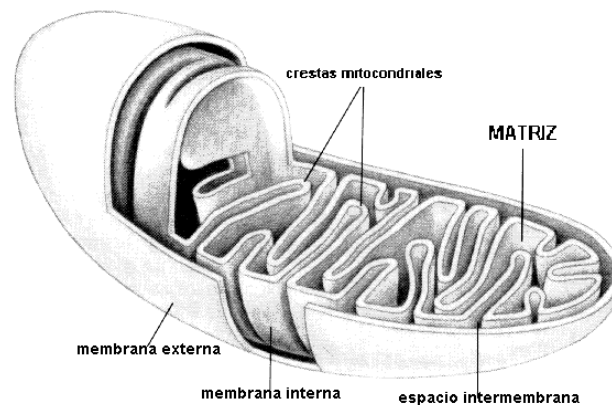
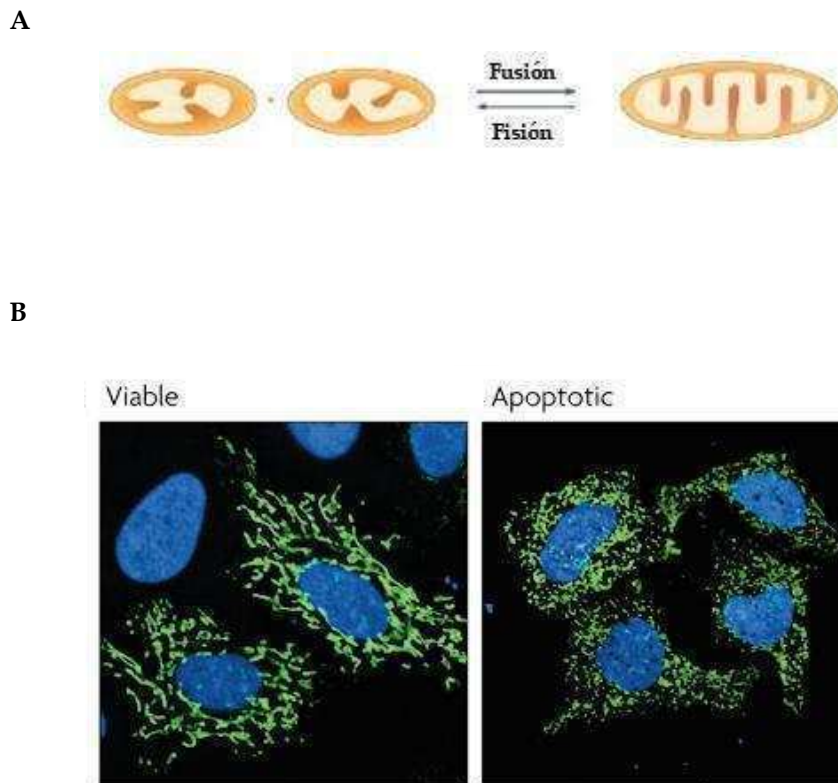


Figura 9. Características ultraestructurales de la mitocondria

La membrana externa es una bicapa lipídica permeable a distintos iones, metabolitos y péptidos, gracias a la presencia de proteínas que forman poros permitiendo el paso de moléculas de hasta 10 KDa. La membrana interna, en cambio, carece de poros y es altamente selectiva, presenta gran cantidad de proteínas, tales como complejos enzimáticos implicados en la cadena respiratoria- fosforilación oxidativa, y sistemas de transporte. Esta membrana forma invaginaciones o pliegues, llamados crestas mitocondriales, las cuales aumentan de manera considerable la superficie de la misma. En la matriz mitocondrial se encuentran iones, metabolitos, ADN, ribosomas y proteínas involucradas en el Ciclo de Krebs.

La morfología mitocondrial es muy variable no sólo dependiendo del tipo celular sino también dentro de la misma célula, donde adquieren una variedad de morfologías que van desde pequeñas esferas, hasta largos filamentos interconectados. Estudios de imágenes realizados en células vivas, demostraron que las mitocondrias se mueven constantemente a través del citoesqueleto y sufren transiciones estructurales, definiéndolas, de esta manera, como organelas altamente **dinámicas**. Mitocondrias aisladas contactan entre sí durante dichos movimientos y se **fusionan**, resultando en la unión de las bicapas lipídicas de ambas membranas, y del contenido intramitocondrial. De manera similar dos o más mitocondrias

pueden dividirse por **fisión** generando mitocondrias independientes (Figura 10). La fusión y fisión mitocondrial son las responsables de la morfología variable de la mitocondria y están involucrados en la modulación de importantes mecanismos, como el estado redox, la integridad del ADN mitocondrial, la función de la mitocondria y la muerte celular entre otros (Liesa et al., 2009).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 10. Procesos de fusión y fisión mitocondrial. (A) Esquema de mitocondrias fusionándose y fisionándose. (B) Microscopía de mitocondrias teñidas con MitoTracker, donde se muestra la morfología de células viables, con mitocondrias formando filamentos (panel de la izquierda), y de células apoptóticas, con sus mitocondrias fragmentadas (panel de la derecha).

La división o **fisión** es esencial para permitir un rápido tráfico de estas organelas hacia sitios de mayor requerimiento energético dentro de la célula. Además, juega un papel fundamental en la división celular donde las mitocondrias deben distribuirse entre las células madre e hija (Rube y van der Blik, 2004), y por último juega un rol importante en la marcación para mitofagia y subsecuente eliminación de mitocondrias severamente dañadas (Twig et al., 2008).

El proceso de fisión es compensado con el proceso opuesto denominado **fusión**, el cual ayuda a mantener un número constante de mitocondrias. Cuando la fusión predomina las

mitocondrias se tornan altamente interconectadas formando una estructura en forma de red (Smirnova et al., 2001).

La **fusión** lleva al establecimiento de un continuo mitocondrial, permitiendo la disipación de energía, de potenciales de membrana y de iones, como el Ca^{++} , a lo largo de toda la célula. Además se han descrito procesos de complementación de productos génicos mitocondriales, de manera que se restituye la funcionalidad de aquellas mitocondrias que se encuentren dañadas al fusionarse con mitocondrias intactas (Ono et al., 2001) (Figura 11).

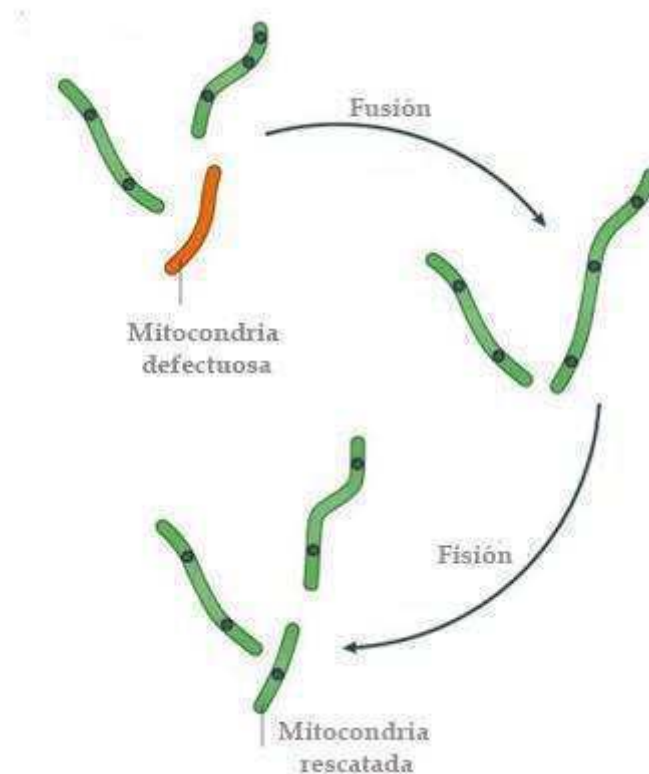


Figura 11. Complementación mitocondrial

Existen hipótesis que proponen a este dinamismo entre fusión y fisión mitocondrial como un checkpoint de calidad, para garantizar la funcionalidad de la misma (Twig et al., 2008). Las diferencias en la expresión de la maquinaria de la fusión y fisión mitocondrial afectarían el balance de la dinámica mitocondrial (Figura 12), explicando el amplio espectro de morfologías mitocondrial observadas en los diferentes tipos celulares de mamíferos (Meeusen y Nunnari, 2005)

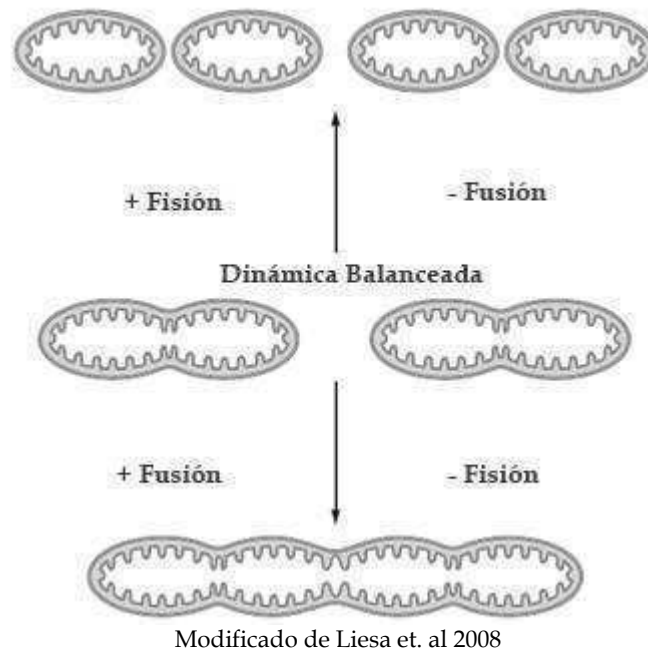


Figura 12. Dinámica Mitocondrial

- **Los mediadores moleculares de la fusión y fisión mitocondrial**

Durante la última década, varios componentes celulares han sido identificados como mediadores claves en la fusión y fisión mitocondrial (Hoppins et al., 2007). Proteínas altamente conservadas tanto de manera estructural como funcional han sido blanco de numerosos estudios.

FUSIÓN:

Las proteínas GTPasas relacionadas con la familia de las Dinaminas¹ (Dynamamin-related GTPases), Mitofusina 1, 2 (Mfn-1, Mfn-2) y OPA-1 son esenciales en el proceso de fusión mitocondrial en mamíferos (Rojo et al., 2002). El proceso de fusión mitocondrial involucra numerosos pasos que incluyen el anclaje y fusión de membranas externas, la fusión de membranas internas y la mezcla de componentes intramitocondriales.

FISIÓN:

La fisión mitocondrial en las células de mamíferos está regulada principalmente por dos proteínas; una con actividad GTPasa denominada **Proteína Relacionada con las Dinaminas 1** (DRP1: Dynamamin-related protein 1) y otra denominada **proteína de Fisión 1** (Fis-1: Fission protein 1). El interés en esta proteína creció considerablemente luego de demostrar que la fisión mitocondrial mediada por DRP1 era relevante en la inducción de la apoptosis, de manera que la inhibición de DRP1, disminuía la susceptibilidad de las células a morir por apoptosis (Frank et al., 2001). Fis-1, es el factor limitante de la fisión, dado que su sobreexpresión produce la

¹ Las Dinaminas son GTPasas que regulan el tráfico vesicular y la endocitosis

fragmentación del entramado mitocondrial. La sobreexpresión de Fis1, también causa la liberación del citocromo *c*, estimulando la apoptosis, de manera que la fisión mitocondrial inducida por Fis-1 está involucrada en la apoptosis. Además se ha reportado una actividad apoptótica de Fis-1 independiente del proceso de fisión mitocondrial (Lee et al., 2004).

- **Fisión mitocondrial durante la apoptosis**

Diferentes estudios han demostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis, dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas (Frank et al., 2001). Las mismas se fragmentan debido a un aumento en la actividad de fisión, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y el remodelado de las crestas de la membrana mitocondrial interna. Estos dos últimos eventos permiten la liberación de los contenidos del espacio intermembrana como el citocromo *c* y SMAC/Diablo hacia el citosol (Bossy-Wetzel et al., 2003). El citocromo *c* se localiza preferentemente en los compartimentos de las crestas mitocondriales, por lo que la remodelación de las mismas es un paso imprescindible para producir su liberación.

Estos tres cambios estructurales se producen en momentos similares, pero su secuencia temporal y enlace causal siguen siendo materia de controversia, de todas formas se sabe que se producen de manera temprana y previo a la inducción de las caspasas.

Una conexión directa entre la maquinaria de la fisión mitocondrial y la apoptosis ha surgido del análisis de la localización subcelular de Bax y Bak, las cuales se reclutan en fosas específicas de la membrana externa mitocondrial en las primeras etapas de la apoptosis (Nechushtan et al., 2001). Estas fosas, a su vez, también colocalizan con DRP1 y Mfn-2 en los futuros sitios de fisión y apoyan la idea de que Bax y Bak participarían en el proceso de corte y división de la mitocondria.

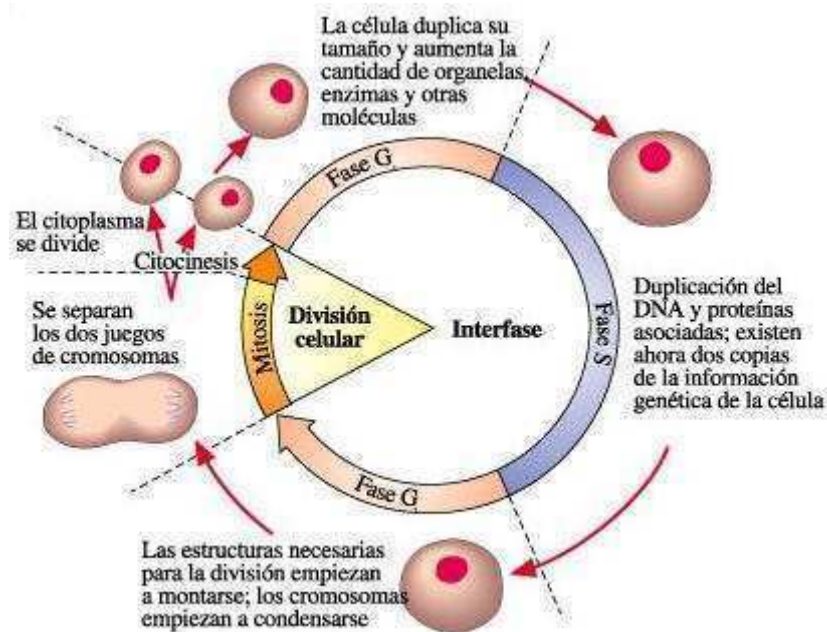
CICLO CELULAR

El ciclo celular es el proceso a través del cual, las células se multiplican o proliferan. Es un conjunto de eventos que transcurren desde que una célula se origina hasta que se divide en dos células hijas. Se compone de cuatro fases secuenciales, molecularmente bien definidas: **G₁**, **S**, **G₂** y **M**. Las fases **G₁** y **G₂** (Gap o intervalos) son fases metabólicamente muy activas donde se produce el crecimiento celular. La fase **S** (Síntesis) consiste en la duplicación del contenido genético de la célula, es decir la replicación del ADN, el cual va a ser distribuido a cada una de las células hijas. Por último la fase **M** (Mitosis) consiste en la división de todo el material celular y concluye con la citocinesis (Figura 13A). La duración completa del ciclo varía dependiendo

del tipo celular. Cuando las células no se encuentran proliferando se dice que han salido del ciclo celular y están en estado de quiescencia o G_0 .

El tránsito a través de estas cuatro fases está altamente regulado por un número importante de proteínas, donde las quinasas dependientes de Ciclinas (CDKs 1, 2, 4, 6) y las Ciclinas (A, B, D y E) cumplen un rol fundamental (Kim y Zhao, 2005) (Figura 13B).

A



B

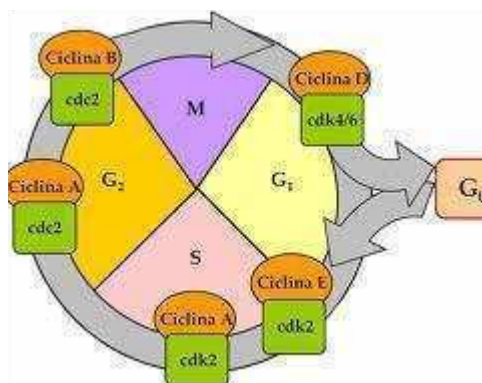


Figura 13. Etapas del Ciclo Celular: (A) Fases del ciclo celular. (B) Complejos de Ciclinas/CDKs intervinientes en cada etapa del ciclo celular.

- **Encendido del Ciclo Celular**

Es necesario un estímulo mitogénico para que la célula abandone su estado de quiescencia e ingrese al ciclo celular. Aquellas proteínas que constituyen una señal o estímulo que le indica a la célula que entre en proliferación, son conocidas como **factores de crecimiento**. Dichos factores ejercen su efecto a través de un receptor específico situado en la célula blanco y desencadenan vías de señalización específicas, donde las fosforilaciones son las actividades enzimáticas predominantes, llevando al inicio del ciclo. Existen numerosos factores de crecimiento, censados por la célula, y dependiendo del contexto de señales recibidas por la misma, ésta tomará la “decisión” de proliferar o no.

Transición G₁/S

La producción de Ciclina D promueve el inicio del recorrido por las fases del ciclo celular, al formar un complejo con las CDK 4/6 y activarlas. Estas ciclinas, tienen como sustrato a la proteína del Retinoblastoma (Rb), una proteína supresora de tumor que en su forma hipofosforilada bloquea a los factores de transcripción E2Fs (E2F1, 2 y 3a: Activantes) (Kim y Zhao, 2005), los cuales son esenciales para la expresión de genes específicos, permitiendo la progresión del ciclo celular.

La fosforilación parcial de Rb por el complejo Ciclina D/CDK, libera a los E2Fs activantes, los cuales tienen la capacidad de reemplazar al complejo represor p107/E2F4 de sus promotores blanco e inducir la transcripción de la Ciclina E y la fosfatasa cdc25A, entre otras proteínas. Dicha fosfatasa remueve los grupos fosfatos inhibidores de la CDK2 y permite la formación del complejo Ciclina E/CDK2, que culmina con la inactivación del Rb. Otras proteínas cuya expresión se encuentra inducida por los E2Fs activantes, son la Ciclina A, Ciclina B y proteínas de la maquinaria de replicación (Figura 14).

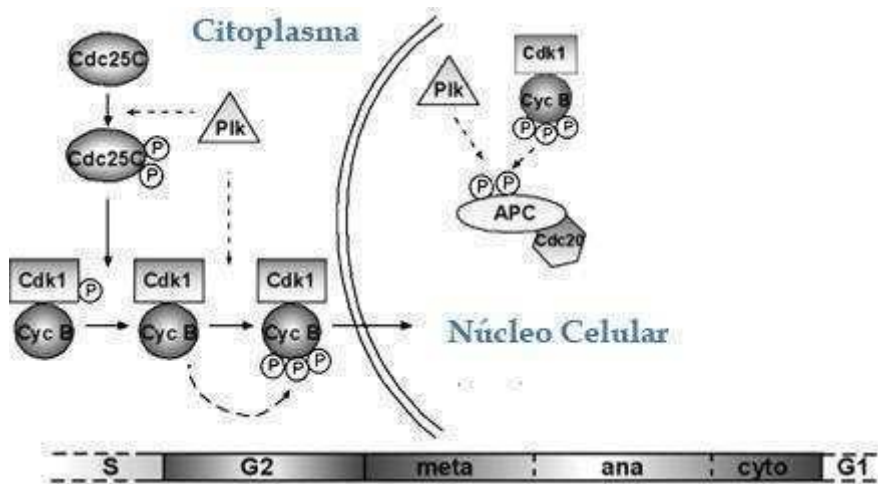


Figura 15. Transición G₂/M

- **Proteínas Inhibitorias del ciclo celular**

Existen además, otros actores importantes en el control del ciclo celular, como las proteínas inhibitorias de CDKs (CKIs). Se trata de proteínas supresoras de tumores que bloquean la actividad de los complejos CDKs/ciclinas y causan arrestos en fases específicas del ciclo celular, dependiendo donde se encuentre el complejo ciclina inhibido. Han sido descritas dos familias de CKIs, la familia INK4 (Inhibitors of Kinase 4) y la familia CIP/KIP (CDKs inhibitor proteins).

La familia INK4 se compone de las proteínas p15, p16, p18 y p19, todas ellas interactúan con las CDKs 4 y 6 provocándoles un cambio conformacional que impide su unión con la ciclina D.

La familia CIP/KIP, incluye a las proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} que bloquean a las ciclinas A, B, D y E y a las CDK1 (o CDC2) y CDK2 y a los complejos ya formados por estas (Kim y Zhao, 2005) (Figura 16).

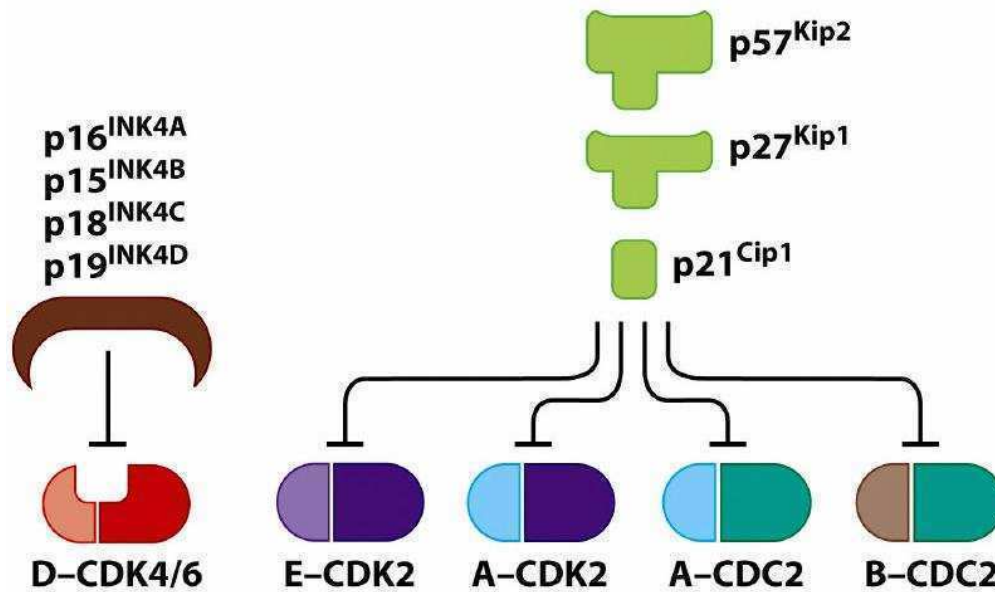


Figure 8-13a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Figura 16. Inhibidores de CDKs (CKIs)

p27^{Kip1}

La p27^{Kip1} es una proteína nuclear que regula negativamente la progresión de la fase G₁ del ciclo celular, secuestrando e inactivando los complejos ciclina E o A/CDK2 (Toyoshima y Hunter, 1994). Su actividad es controlada por su concentración proteica, su distribución entre diferentes complejos celulares y su localización subcelular.

Los niveles de p27 se encuentran elevados en células quiescentes y disminuyen luego de una estimulación mitogénica que induce la entrada en G₁ del ciclo celular (Coast et al., 1996). El mecanismo principal por el cual p27 es regulado, es a través de su degradación proteolítica. (Pagano et al., 1995). La ubiquitinación, seguida de proteólisis es el mecanismo que causa la degradación de p27 en G₁ tardía y fase S del ciclo celular. CDK2 se activa en G₁ tardía y fosforila a p27 en el residuo Thr187. Este evento genera un sitio de reconocimiento para la enzima Skp2-SCF E3 ubiquitin ligasa, la cual ubiquitina a p27 y la marca para su degradación por el proteosoma (Sheaff et al., 1997).

Una interacción estable con complejos ciclina-CDK, es importante para la regulación por proteólisis de p27, debido a que se ha reportado que mutaciones en p27, que inducen una pérdida de interacción de esta proteína con las ciclinas y CDKs, inhiben la eficiente degradación de la misma (Montagnoli et al., 1999).

Sin embargo, un modelo de ratones knock-in en Thr187 de p27, resistentes a la fosforilación por CDK2, reveló que si bien p27 se acumulaba en la fase S, seguía siendo degradada normalmente durante la fase G₀ y G₁, sugiriendo la existencia de otro mecanismo de degradación de esta proteína (Malek et al., 2001). De hecho, se ha descrito la degradación de p27 en el citoplasma, durante la fase G₁, mediada por las enzimas KPC1 y KPC2 E3 ubiquitin

ligasas (Kamura et al., 2004). La exportación nuclear de p27 es necesaria para que KPC1 y KPC2 medien su degradación. Cuando p27 es confinado a localizarse en el núcleo como resultado de la inhibición de su exportación nuclear debida a fármacos u otra causas, su estabilidad disminuye (Rodier et al., 2001). Por lo que es probable que otro mecanismo de regulación de su degradación esté actuando en el núcleo, durante G_1 .

El principal sitio de fosforilación de p27 es la Ser10, dicho sitio es capaz de regular, tanto la locación subcelular, como la estabilidad de p27 (Ishida et al., 2000). Sin embargo, dicha fosforilación que está asociada a la estabilización de p27 en células quiescentes, está también relacionada con su degradación en fase G_1 . Numerosos grupos han reportado que la fosforilación en Ser10 de p27, es necesaria para su exportación del núcleo, posiblemente mediante su unión a la proteína exportina CRM1 (Rodier et al., 2001). Esto induce la degradación citoplasmática de p27, en células en G_1 , posiblemente por la vía de KPC.

En conclusión, la regulación de la estabilidad y localización subcelular de p27, son eventos críticos para el control de la función de esta proteína, y determinan complejos fenómenos modulados por numerosas fosforilaciones e interacciones proteína-proteína.

ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Los ROS son especies químicas producto del metabolismo normal de los organismos aeróbicos. El oxígeno molecular es utilizado por los organismos aeróbicos para una producción eficiente de energía como aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones. La reducción parcial del oxígeno molecular da como resultado la formación de especies radicalarias (Figura 17).

La denominación ROS agrupa tanto a las especies radicalarias como no radicalarias derivadas del oxígeno, que poseen mayor reactividad que éste. Dentro de las especies radicalarias podemos encontrar al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radical peroxilo (RO_2^{\cdot}), radical alcoxilo (RO^{\cdot}), oxígeno singulete; dentro de las especies reactivas no radicalarias encontramos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), entre otros (Halliwell y Chirico, 1993).

| | | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | O_2 | \rightleftharpoons | $\text{O}_2^{\circ-}$ | \rightleftharpoons | H_2O_2 | \rightleftharpoons | OH° | \rightleftharpoons | H_2O |
| Potencial de Reducción (V) | | | 0,94 | | 0,32 | | 2,31 | | |
| Tiempo de vida media (seg) | | | 10^{-6} | | 10^{-5} | | 10^{-9} | | |
| Concentración <i>in vivo</i> (M) | | | 10^{-10} | | 10^{-7} | | 10^{-15} | | |

Figura 17. Reducción del Oxígeno molecular. El potencial de reducción es la medida en Voltios (V) de la afinidad de la especie química por los electrones, comparado con el hidrógeno. El H_2O_2 presenta la reactividad más baja y la estabilidad y concentración *in vivo* más alta (Giorgio et al., 2007).

Existen numerosas fuentes de generación de ROS dentro de la célula, la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, el metabolismo oxidativo de xenobióticos llevado a cabo por la familia de hemoproteínas del citocromo P-450, sistemas enzimáticos, metabolismo de ácidos grasos en los peroxisomas, entre otras.

- **Fuentes endógenas de ROS**

Cadena de transporte de electrones mitocondrial:

El metabolismo energético celular se basa en la producción de ATP a través de la cadena de transporte de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa, en la membrana interna mitocondrial. Se trata de un proceso que utiliza la oxidación controlada del NADH y el FADH_2 para generar un potencial de energía de protones a través de los complejos proteicos ubicados en la membrana mitocondrial, que llevará finalmente a la fosforilación del ADP. Durante este proceso los electrones fluyen a través de los complejos I, II, III, y IV por transferencia a los grupos flavinas, centros Fe-S, grupos hemo y iones cobre que poseen dichos complejos, hasta la reducción total del O_2 a H_2O . Los encargados de transportar los electrones de un complejo al siguiente son la ubiquinona y el citocromo *c*. La principal fuente de ROS celular (alrededor del 90%) proviene de dicha cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 18). Aproximadamente el 0,1 % del oxígeno consumido es derivado a la formación de ROS como resultado de la autooxidación de ciertos componentes de la cadena de transporte de electrones, principalmente el complejo I y III.

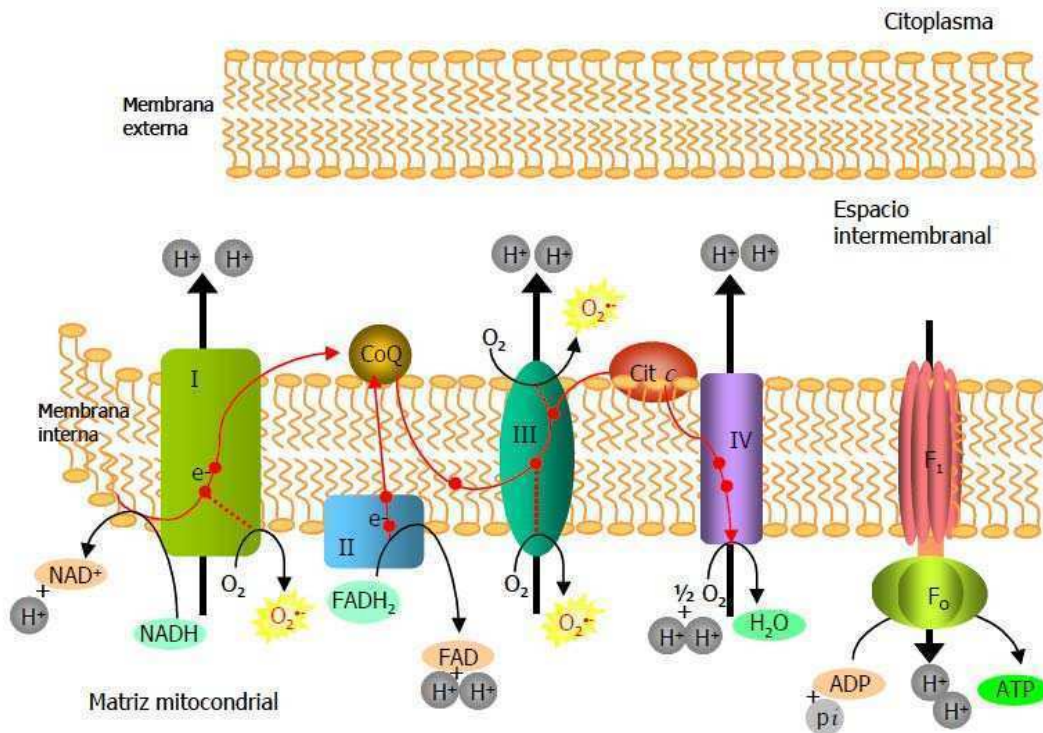


Figura 18. Cadena de transporte de electrones en eucariotas superiores. Existen numerosos sitios de la cadena donde los electrones pueden interactuar directamente con el O₂ o con otro aceptor de electrones, generando de esta manera ROS.

Metabolismo oxidativo de xenobióticos: Enzimas del Citocromo P450:

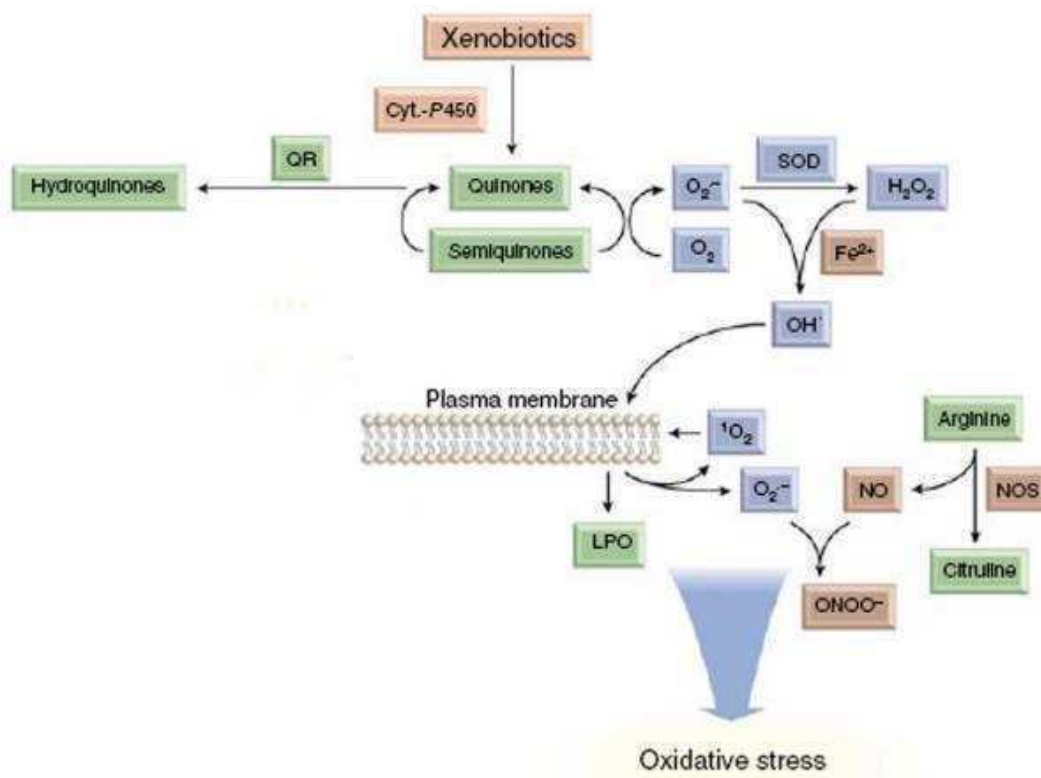
A lo largo de la evolución los organismos vivos han estado expuestos de forma continua a un número creciente de sustancias químicas extrañas presentes en su entorno. Dichos compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual de los seres vivos, pero que son capaces de ingresar en los mismos, se los conoce con el nombre genérico de **xenobióticos**, entre los que se encuentra el HCB.

Los xenobióticos, dentro de la célula, no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermedio y no son degradados a través de éstas. Frente a esta situación se han seleccionado a través de la evolución sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Se trata de una serie de enzimas no integradas a las vías del metabolismo energético cuya función principal es la de convertir a los xenobióticos en compuestos más polares, hidrosolubles y por lo tanto más fácilmente excretables, mediante reacciones de oxidación, reducción, y/o hidrólisis. Se trata de proteínas catalíticas de diversa naturaleza, entre las que se encuentran las enzimas con actividad monooxigenasa como las enzimas de la superfamilia de enzimas del citocromo P-450 (CYP), ubicadas en la membrana del Retículo Endoplasmático. Originalmente se pensaba que

dichas enzimas eran las responsables de la metabolización únicamente de drogas y su localización era exclusiva del hígado, sin embargo hoy se sabe que las enzimas que metabolizan xenobióticos participan de numerosas funciones cruciales dentro de la célula y probablemente se encuentren en todas las células eucariotas.

Todas las enzimas de la superfamilia CYP poseen un grupo hemo unido a la cadena polipeptídica mediante una unión no covalente.

Durante el metabolismo de xenobióticos las CYP consumen una única molécula de O_2 , generando un sustrato oxidado junto con una molécula de agua como subproducto. Sin embargo, para la mayoría de las CYP, dependiendo de la naturaleza del sustrato, la reacción que catalizan es desacoplada, consumiendo más de una molécula de O_2 y produciendo de esta manera ROS (González et al., 2006). Además, muchos de los compuestos xenobióticos son convertidos por las enzimas CYP a quinonas tóxicas, las cuales son agentes sensibles a reacciones redox, reduciéndose reversiblemente a semihidroquinonas/hidroquinonas, generando anión superóxido (Kammer et al., 1999) (Figura 19).



Extraído de Namazi , 2009.

Figura 19. Generación de ROS por las enzimas CYP. Producción de anión superóxido (O_2°) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como resultado del metabolismo de xenobióticos por enzimas CYP. Ambas especies pueden, además, ser convertidas en radical hidroxilo (OH°) por las reacciones de Haber-Weiss y Fenton catalizadas por el ion Fe^{++} .

Otros sistemas enzimáticos de generación de ROS:

Entre los sistemas enzimáticos de generación de ROS podemos destacar a la enzima xantina oxidasa y la enzima NADPH oxidasa.

La enzima xantina-oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico, durante la cual se acopla una reducción de O_2 y la consecuente generación O_2° .

La enzima NADPH oxidasa fue descubierta originalmente en los neutrófilos donde presenta un rol principal en la generación de O_2° durante la fagocitosis, cumpliendo una función vital en la defensa no específica del hospedador frente a patógenos. En los últimos años se ha descubierto que células no fagocíticas como las células endoteliales y los fibroblastos, entre otras, poseen también niveles de O_2° producidos por la NADPH oxidasa. A diferencia de la NADPH oxidasa de los neutrófilos, la NADPH oxidasa de las células no fagocíticas producen constitutivamente O_2° en niveles bajos, aún en situaciones de no estimulación, y si bien los niveles aumentan frente a señales determinadas no alcanzan a los producidos en una célula fagocítica activada. Se cree que las cantidades bajas de O_2° generadas por la NADPH oxidasa de células no fagocíticas intervienen como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales sensibles a redox, sin embargo la regulación en alta (up-regulation) de estas enzimas llevaría a un aumento en los ROS intracelulares que contribuirían al estrés oxidativo celular (Griendling y Ushio-Fukai, 2000; Zalba et al., 2001).

Metabolismo de ácidos grasos dentro de los peroxisomas:

El metabolismo de los ácidos grasos dentro de los peroxisomas es otra fuente endógena importante de ROS, donde se genera H_2O_2 por la acción de la enzima acil-CoA oxidasa.

Existen también Fuentes exógenas de generación de ROS como la exposición a radiaciones X, γ y UV.

- **Estrés Oxidativo**

El estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes (Figura 20), que como veremos a continuación existen de manera abundante y de distinta naturaleza dentro de la célula. Este desbalance se puede producir por numerosas causas, ya sea por pérdida o mal funcionamiento de la defensa antioxidante o por aumento en la producción ROS. En este sentido podemos definir al estrés oxidativo como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de ROS, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas.

Como consecuencia de este desbalance se genera una variedad de alteraciones bioquímicas y fisiológicas, que pueden resultar en diversas formas de daño celular y tisular.

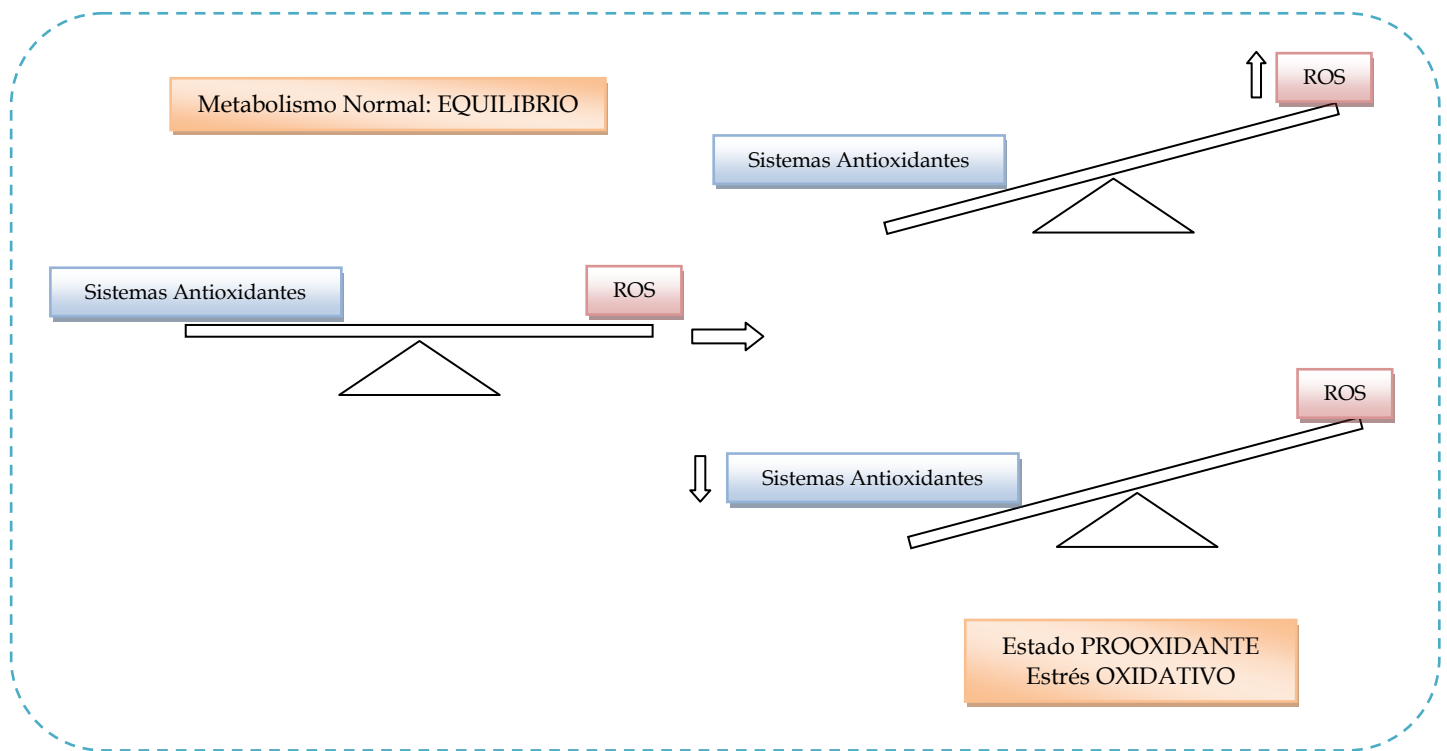


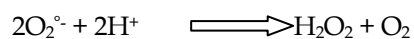
Figura 20. Estrés Oxidativo

- **Sistemas Antioxidantes:**

Los ROS se producen continuamente en el interior de la célula como parte del metabolismo, de manera que existe un sistema complejo de defensa que permite un balance entre la producción de las mismas y la activación de la función de los antioxidantes. Existen dos mecanismos principales que contribuyen a disminuir los efectos perjudiciales del estrés oxidativo celular, un mecanismo enzimático y un mecanismo no enzimático.

El sistema de defensa enzimática está dado principalmente por la actividad de las enzimas superóxido-dismutasa (SOD), catalasa, y glutatión-peroxidasa (Kamata y Hirata, 1999; Valko y Rhodes, 2006), mientras que la defensa no enzimática está dada por compuestos antioxidantes, que actúan como secuestradores de radicales libres primarios, como quelantes de iones metálicos o mediante la interrupción de cadenas de peroxidación, tales como Vitaminas A, C y E, entre otras y compuestos tales como el glutatión.

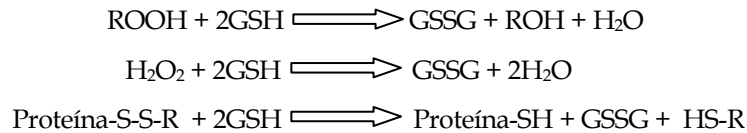
La enzima SOD cataliza la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 :



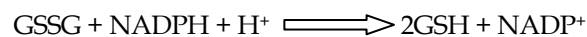
La enzima catalasa cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O :



La enzima glutation-peroxidasa es el principal sistema de protección antioxidante endógeno y cataliza las siguientes reacciones:



El GSSG formado se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutation-reductasa:



Las tres enzimas mencionadas se localizan en distintos compartimentos intracelulares y desempeñan funciones complementarias entre sí.

La catalasa se localiza predominantemente en los peroxisomas y mitocondrias. Las enzimas de la familia glutation-peroxidasa se localiza en lisosomas, mitocondrias y citosol, pero no en peroxisomas. En mamíferos, se conocen ocho isoformas (GPx1-8) de esta enzima.

Existen tres isoformas de la enzima SOD, con distinta localización subcelular. La Cu/Zn-SOD (SOD1) esta predominantemente localizada en el citosol, la Mn-SOD (SOD2) está localizada en la mitocondria, mientras que la EC-SOD (SOD3) se encuentra en el espacio extracelular (Rodríguez-Iturbe et al., 2007).

El sistema antioxidante no enzimático, consta de diversos compuestos naturales que tienen la capacidad de reaccionar con los radicales libres. Entre los compuestos que integran este tipo de defensa antioxidante se encuentran los compuestos de origen endógeno, como el Glutathión o γ -Glutamyl-Cisteinyl-glicina (GSH), la bilirrubina, los α -cetoácidos (piruvato, α -cetoglutarato), el ácido lipoico, ubiquinol (coenzima Q reducida) y compuestos de origen exógeno incorporados a la célula a través de la dieta, como el tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), los β -carotenos (vitamina A) y los polifenoles principalmente los flavonoides.

- **Efecto del Estrés oxidativo sobre biomoléculas**

El estrés oxidativo puede causar daño en todo tipo de biomoléculas, incluyendo el ADN, los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. El radical hidroxilo (HO°), generado principalmente por la reacción de Fenton a partir del peróxido de hidrógeno (Figura 21), es una de las especies reactivas del oxígeno que genera daño en la mayoría de las biomoléculas.

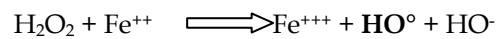


Figura 21: Reacción de Fenton

El **ADN**, tanto mitocondrial como celular, es blanco principal del ataque del radical HO° , causando alteraciones en sus bases, como la formación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OH-dG) cuando se produce el ataque sobre la guanina, fragmentación de las hebras tanto simple como doble cadena, daño en los azúcares, entrecruzamiento (crosslinking) del ADN a proteínas (Poulsen et al., 1998). Como consecuencia del ataque al ADN se disparan señales de respuesta al daño que llevan a su reparación, en primera instancia reparando mutaciones, deleciones o traslocaciones que pudieran haberse generado y en última instancia activando señales de arresto celular y/o la muerte celular por apoptosis.

Los **lípidos** son también moléculas blanco del daño producido por los radicales libres. Durante la peroxidación lipídica se produce la oxidación de ácidos grasos polinsaturados a través de una reacción en cadena que propaga y amplifica el ataque inicial de un agente oxidante sobre un lípido determinado. El mecanismo de la peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un oxidante sobre la cadena de un lípido insaturado dando lugar a un radical alquilo (L°) como resultado de la abstracción de un átomo de hidrógeno. A su vez este radical reacciona rápidamente con el oxígeno molecular para formar el radical peroxilo (LOO°). La fase de propagación de la peroxidación lipídica se produce cuando el LOO° sustrae el hidrógeno de ácidos grasos adyacentes para dar un hidroperóxido lipídico (LOOH) y nuevamente el radical alquilo. Los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de moléculas endógenas por medio de entrecruzamiento y fragmentación de moléculas.

Las principales consecuencias de este tipo de oxidación son la pérdida de la integridad y función de las membranas celulares, tanto de la membrana plasmática como de las membranas de organelas intracelulares, alterando su fluidez y permeabilidad, lo que puede conducir a un proceso de muerte celular. Además la peroxidación lipídica tiene como resultado la formación de productos tóxicos y potencialmente bioactivos como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (Esterbauer et al., 1991).

Por último las **proteínas** son uno de los principales blancos del ataque de los ROS, debido a su abundancia dentro de la célula. Los ROS producen modificaciones de aminoácidos, fragmentación de cadenas polipeptídicas, alteración de cargas eléctricas, y oxidación de aminoácidos específicos que llevan a reacciones de entrecruzamiento.

En general la oxidación conduce a una pérdida total o parcial de la función de la proteína (Dalle-Donne et al., 2006). Sin embargo el ataque de los ROS sobre las proteínas puede causar modificaciones tanto reversibles como irreversibles de las mismas. Las modificaciones reversibles, generalmente producidas en los residuos cisteína, pueden ser reparadas por enzimas específicas, a través de la regulación redox. Mientras que las modificaciones irreversibles, no pueden ser reparadas, por lo que, si llevan a la inactivación de las mismas, éstas se acumulan o las proteínas son degradadas. Un ejemplo de modificación irreversible es la carbonilación de las proteínas, es decir la generación de grupos carbonilos por oxidación, en las cadenas laterales de los aminoácidos especialmente en los residuos de arginina, prolina, lisina y treonina, a aldehídos o cetonas (Berlett y Stadtman, 1997).

- **Papel de los ROS en los procesos de apoptosis**

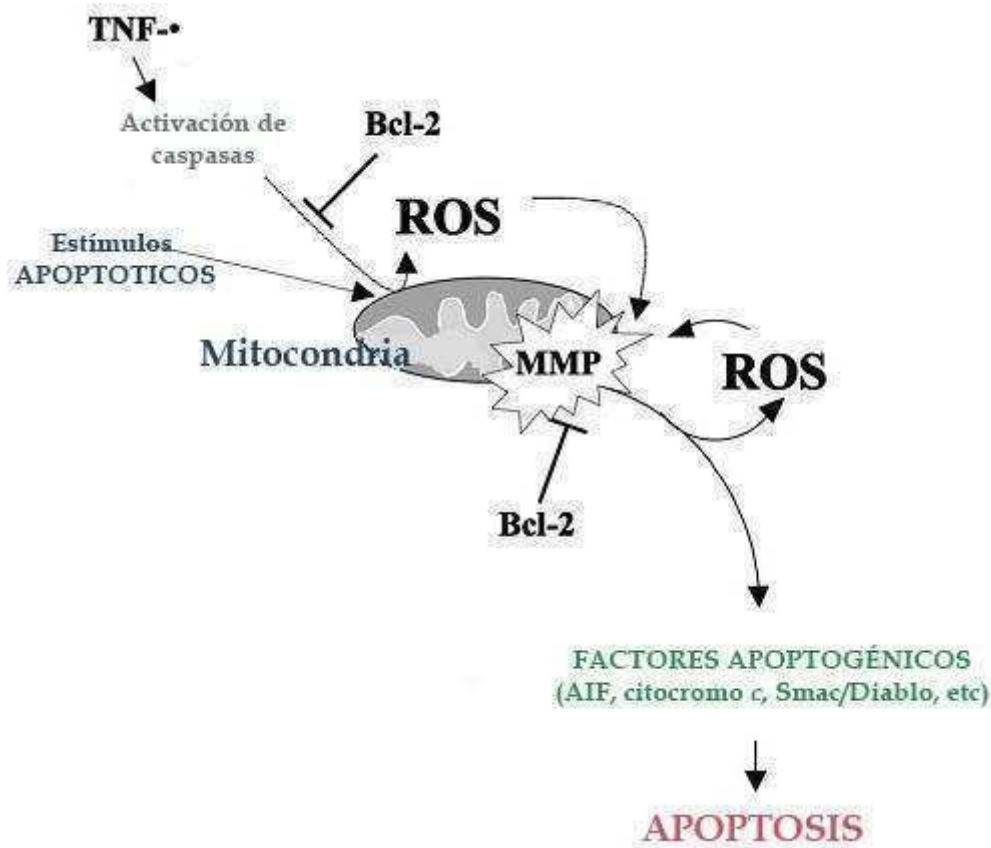
Existe numerosa evidencia que sugiere que los ROS y el subsecuente estado oxidativo celular, podría actuar como estímulo inductor de múltiples mecanismos que conducirían a la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis (Kannan y Jain, 2000). Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento directo de células en cultivo con peróxido de hidrógeno, induce la muerte celular por apoptosis (Liu et al., 1999), y que la adición de antioxidantes como la N-acetilcisteína, o la sobreexpresión de enzimas antioxidantes intracelulares bloquean de manera completa, o retardan el efecto. Incluso, ciertas proteínas con actividad anti-apoptótica de la familia Bcl-2, como la propia Bcl-2, ejercen su función aparentemente a través de un mecanismo antioxidante (Cai y Yang, 1998).

El rol de los ROS en la inducción de la apoptosis ha sido descrito para una amplia gama de xenobióticos como el arsénico (Liu et al., 2004), el selenio (Li et al., 2003), el Emodin (Jing et al., 2002), la N-(4-hidroxifenil) retinamida (Tosetti et al., 2003) y la 15-Deoxi-delta12,14-prostaglandina J2 (Chen et al., 2002) entre otros tantos compuestos. El mecanismo general para la inducción apoptótica de los xenobióticos es la producción de un aumento en los niveles de ROS que lleva a la activación de las vías de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs "Mitogen Activated Protein Kinases) y la liberación del citocromo *c* de la mitocondria, activando de esta manera la vía intrínseca de apoptosis (Owuor y Kong, 2002) este tipo de muerte celular se la conoce genéricamente como vía apoptótica de xenobióticos o su nombre en inglés "xenobiotic apoptosis pathway". Si bien el hecho de que los ROS activan MAPKs está bien documentado, el mecanismo aún no está esclarecido completamente. Sin

embargo, existe un modelo aceptado que propone que la activación transiente de ROS inactiva fosfatasa reguladoras de las MAPKs, vía interacción con un residuo de cisteína, sensible a redox, en el sitio activo (Denu y Tanner, 1998).

De todas formas, aunque la participación de los ROS en la apoptosis sea ya un hecho claro y bien documentado, todavía no hay suficiente evidencia para determinar si los ROS juegan un papel central en la inducción de la apoptosis o si, en algunos casos, son una consecuencia del proceso apoptótico, actuando en la apoptosis como mecanismo de feedback positivo (Fruehauf y Meyskens, 2007). Respecto de esto, está reportado que muchos estímulos apoptóticos producen la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria, como el citocromo *c*, el AIF, EndoG, entre otros, acompañado de una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y la apertura del poro de permeabilidad transitoria y/o canales dependientes de voltaje en la membrana mitocondrial (Figura 22). Estos eventos producen la liberación de O_2^\bullet de la mitocondria, incrementando el estrés oxidativo celular (Garrido y Galluzzi, 2006).

Otros mecanismos por los cuales los ROS son capaces de inducir apoptosis, son la producción de ceramidas (Scharstuhl et al. 2009), activación de p53 (Lu et al., 2011), regulación de los niveles de proteínas anti-apoptóticas a través de su fosforilación y/o ubiquitinación (Li et al., 2004), etc. Más aún, los ROS son necesarios en el desencadenamiento de la mayoría de las vías de apoptosis (Amstad et al., 1994; Jabs, 1999), estudios en ratones transgénicos demostraron que incrementos en la producción de ROS en células transformadas, pueden prevenir la tumorigenesis que se produce de manera espontánea (Salganik et al., 2000).



Extraído y modificado: Fleury et al., 2002

Figura 22. ROS y APOPTOSIS

LA SUPERFAMILIA DE LAS MAPKS

Las MAPKs son una familia de kinasas de serina/treonina altamente conservadas a lo largo de la evolución, activadas en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares (Su y Karin, 1996; Garrington y Johnson, 1999; Kyriakis y Avruch, 2001; Roux y Blenis, 2004).

Las células responden a una infinidad de cambios en su medio ambiente, regulando funciones celulares como la supervivencia, la proliferación, la diferenciación, la muerte celular, el metabolismo celular, entre otras cosas. Muchos de los cambios producidos en el medio extracelular, como cambios en las concentraciones de citoquinas, de factores de crecimiento, estrés, etc., se traducen en una respuesta celular a través de la activación de las MAPKs.

Las MAPKs se activan por fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina, gracias a la activación de una cascada de fosforilaciones (Cohen y Schmidtmyerova, 1997), en un dominio conservado Thr-X-Tyr. Las proteínas encargadas de su activación se engloban genéricamente dentro del grupo de las kinasas de MAPKs (MKK), las cuales son activadas a su vez por kinasas de MAPKs (MKKK) (Figura 23). Estas MKKK se activan al interactuar con

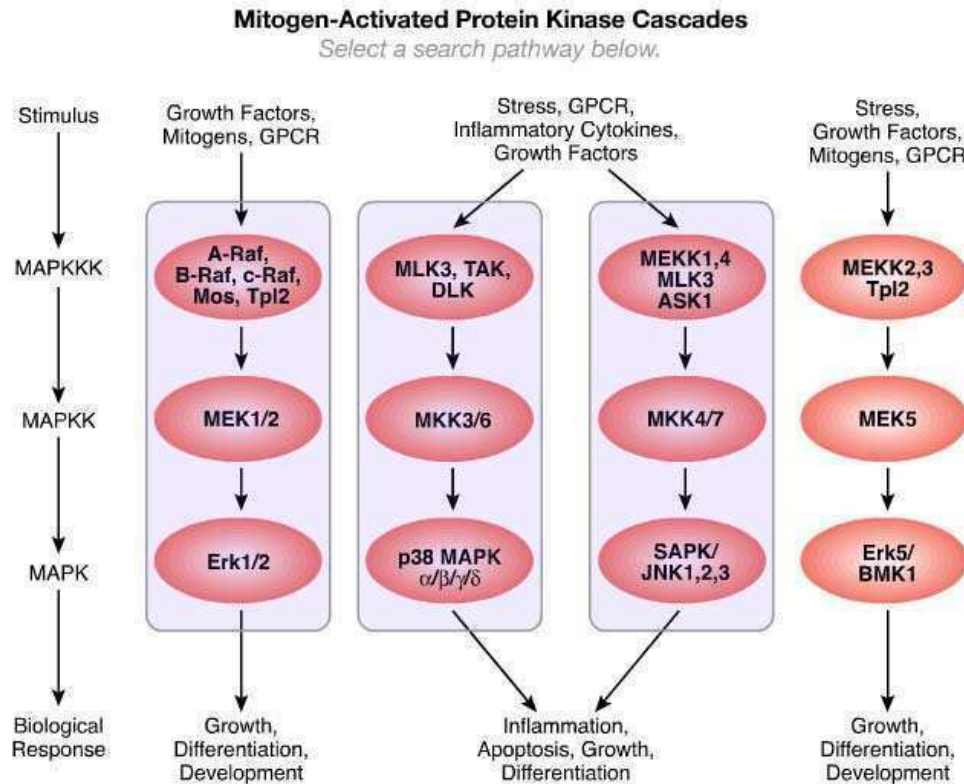
proteínas de la familia de las pequeñas GTPasas y/o con otras proteínas quinasas, contactando así a las MAPKs con el receptor de membrana activado por el estímulo extracelular.

La superfamilia de las MAPKs agrupa a dos familias principales:

- ✓ **Familia de las ERKs (“Extracelular Signals Regulated Kinases”)**
- ✓ **Familia de las MAPKs activadas por estrés: Subfamilia SAPKs también llamada JNKs (c-Jun N-terminal Kinases) y Subfamilia p38 MAPKs**

Las quinasas de la familia de las ERKs son activadas, principalmente, en respuesta a factores de crecimiento y/o mitógenos e intervienen en la progresión del ciclo celular, crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. Su fosforilación se induce mediante una cascada de transducción en la cual participan las proteínas Shc, Grb2, Ras, Raf y las MEK (Vojtek y Der, 1998) (Figura 23).

Las proteínas pertenecientes a la familia de quinasas activadas por estrés, JNK y p38 MAPKs, son activadas fundamentalmente en respuesta a diversos tipos de estrés ambiental como la hiperosmolaridad, la radiación UV, la radiación ionizante, el estrés térmico y el estrés oxidativo, entre otros, e intervienen fundamentalmente, en la detención del ciclo celular y la apoptosis (Kyriakis y Avruch, 1996). Las señales de estrés activarán a pequeñas GTPasas o a alguna proteína de la familia Rho (Rac, Rho, Cdc42), las cuales llevarán a la activación de las MKKs (Rao, 2001). La JNK es fosforilada y activada por las MKK 4/7, y la p38 por las MKK 3 y 6 (Figura 23).



Extraído: Cell Signaling Pathways

Figura 23. Vía de señalización de MAPKs.

- **MAPKs y apoptosis**

La especificidad de la activación y función de la señalización de MAPKs en la apoptosis es determinada por la actividad de numerosos reguladores apoptóticos, incluyendo proteínas scaffold, proteínas adaptadoras, e inhibidoras, las cuales interactúan en algún punto de la cascada de señalización.

ERK

Numerosos son los estudios que asocian la activación transiente de ERK1/2 (p42/p44) a procesos de viabilidad y proliferación celular, a través de diversos mecanismos, tales como la prevención de la apoptosis vía la inhibición de la activación de caspasas (Tran et al., 2001), la inducción de la expresión de factores anti-apoptóticos, como Mcl-1 (Townsend et al. 1998) y la proteína inhibidora de apoptosis (IAP) (Yang y Li, 2000), la inducción de la expresión de la ciclina D y la inactivación de la proteína p27^{Kip1} inhibidora del ciclo celular (Cheng et al., 1998), entre otros.

Sin embargo, nuevos hallazgos sugieren que la activación sostenida de ERK1/2, también estaría involucrada en la muerte celular por apoptosis (Wang et al., 2000; Lee et al., 2005; Kim et al., 2008), por un mecanismo que suprime el ciclo celular induciendo la expresión de proteínas inhibitorias del ciclo como p21^{CIP/WAF} y p27^{Kip1} (Marshall, 1999) y activando proteínas de daño en el ADN.

p38 MAPK -JNK

JNK y p38 son MAPKs activadas preferencialmente por señales que inducen estrés celular, como estrés oxidativo, e insultos químicos, entre otros factores (Weston y Davis, 2002; Johnson y Lapadat, 2002), y están implicadas en la inducción de distintas formas de muerte celular en respuesta a una gran variedad de injurias (Namgung y Xia, 2000). La apoptosis inducida por estrés celular es a menudo mediada por la vía mitocondrial (Green y Kroemer, 2004). La familia Bcl-2 regula este proceso modulando el potencial de membrana y la función mitocondrial. Ha sido de gran interés entender cómo las vías de señalización de las quinasas regulan la función de proteínas de la familia Bcl-2. Se ha reportado que las actividades de numerosos miembros de la familia Bcl-2, como BAD, Bcl-2 y Bcl-xl son regulados por fosforilación (Zha et al., 1996, Maundrell et al., 1997) por parte de JNK y p38.

Estudios recientes demostraron que JNK induce apoptosis por fosforilación directa de BAD y Bim. Bim es una proteína pro-apoptótica con dominio BH3 que pertenece a la familia Bcl-2 (O'Connor et al., 1998). Sumado a esto, hay evidencia que muestra que JNK induce apoptosis por fosforilación y consecuente inactivación de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bcl-2 y Bcl-xl (Basu y Haldar, 2003)

La evidencia de que la regulación de la apoptosis por p38 se da por fosforilación directa de miembros de la familia Bcl-2 es menos concluyente. Sin embargo existen estudios que reportan la inducción de apoptosis por p38 a través de la fosforilación de Bim (Cai et al., 2006).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



Trabajos de nuestro laboratorio demostraron que el HCB es un disruptor del status hormonal tiroideo, y de la homeostasis del crecimiento celular de la glándula tiroides (Alvarez et al., 2005, Chiappini, 2007). La exposición crónica de varias especies de ratas a altas dosis de HCB, produce una marcada hipotiroxinemia debida a un incremento en la deiodinación periférica de T_4 en T_3 , y a un aumento en la excreción de T_4 en la bilis, debido a la inducción de la T_4 -UDPGT1 (van Raaij et al., 1993b; Alvarez et al., 2005). Ciertos compuestos inductores de enzimas microsomales hepáticas, como es la enzima UDPGT, inducen apoptosis y aumentos en la expresión de TGF- β 1 en tiroides de rata (Kolaja et al., 1999).

La TSH es el principal regulador tanto de las funciones tiroideas específicas como del crecimiento de la glándula tiroides. La hipotiroxinemia inducida por la administración de altas dosis de HCB (1000 mg/kg p.c.) a ratas, produce un aumento en los niveles circulantes de TSH, sin aumento en la relación peso tiroideo/peso corporal (Kleiman de Pisarev et al., 1990). La regulación del número de células es esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular. Un ejemplo de ello es la hiperplasia de la glándula tiroides, inducida por bociógenos. Una vez que la glándula alcanza cierto tamaño, su crecimiento se detiene a pesar de la continua administración del bociógeno. Este efecto inhibitorio sobre el crecimiento está acompañado de una elevada expresión de TGF- β 1 (Derwahl y Studer, 2002).

El TGF- β 1, prototipo de una gran familia de citoquinas, juega un rol fisiológico importante en el control del crecimiento de la glándula tiroides (Carneiro et al., 1998). Es un potente inhibidor del ciclo celular, de las funciones diferenciadas tiroideas, tales como la captación de iodo y la biosíntesis hormonal y un inductor de apoptosis en células epiteliales normales (Bechtner et al., 1999, Pisarev et al. 2009). Ha sido demostrado, en numerosos modelos experimentales, que la inducción de apoptosis debida al tratamiento con TGF- β 1 es precedida por un aumento en los niveles de ROS (Sánchez et al., 1996). Altas concentraciones de ROS inducen daño oxidativo a membranas lipídicas, proteínas y ADN, lo que puede resultar en la muerte celular por necrosis y/o apoptosis (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000).

Objetivo General

En base a los antecedentes de la literatura y a nuestros resultados previos, nos propusimos, investigar las bases bioquímicas y moleculares del mecanismo de acción del HCB sobre el crecimiento celular tiroideo, en tiroides de rata y en la línea de células foliculares tiroideas de rata Fisher 344 (FRTL-5). Se analizará el efecto del HCB sobre la proliferación celular y la apoptosis. Nuestra hipótesis es que el HCB, induce un aumento en la expresión génica del TGF- β 1, y produce un desbalance en la homeostasis del crecimiento celular. El HCB

produciría incrementos en los niveles de ROS, desencadenando la muerte celular programada y alteraciones en proteínas regulatorias del ciclo celular, llevando al arresto del mismo.

Objetivos particulares

Para llevar a cabo el objetivo general evaluamos:

- 1) El efecto del HCB sobre:
 - La expresión de TGF- β 1.
 - La proliferación celular.
 - La viabilidad y apoptosis celular. Analizamos las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis, determinando alteraciones en la activación de distintas caspasas involucradas en ambas vías y la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria.
 - Parámetros funcionales tiroideos, tales como la expresión de TG.
 - La activación de MAPKs (ERK1/2, JNK/SAPK y p38).
 - El estado redox celular, analizando la generación de ROS y la expresión de enzimas antioxidantes.
 - La expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, evaluando los niveles de ciclina D1 y p27.
 - El ciclo celular.
- 2) El rol del AhR como mediador de los efectos inducidos por el HCB.
- 3) La participación de TGF- β 1, ROS y MAPKs en el proceso apoptótico.

MATERIALES Y MÉTODOS



ESTUDIOS *in vivo*

Productos utilizados

El HCB (pureza mayor a 99%) fue adquirido de Aldrich-Chemie GmbH & Co (Steinheim, Alemania). El MMI fue un obsequio de Laboratorios Gador, Argentina. Los primers de TGF β -1, catalasa, y el reactivo fenol-isotiocianato de guanidina (TRIZOL) (Gibco BRL Products), fueron adquiridos en Invitrogen Life Technology (Carlsbad, California, USA). Los primers de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) y los reactivos utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) [oligonucleótidos random primers, dinucleósidos trifosfatos (dNTPs), inhibidor recombinante de ribonucleasas (RNAsin), GoTaq ADN polimerasa, M-MLV transcriptasa reversa] fueron obtenidos de Promega Corporation (Madison, WI, USA). La 3,3'-diaminobenzidina (DAB) se compró en Merck (Darmstadt, Germany). Las membranas de polivinil difluoruro (PVDF) se compraron en Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y el kit de quimioluminiscencia (ECL) fue adquirido de GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). La enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) se obtuvo de Sigma Aldrich, Inc. (Saint Louis, MO, USA). Por último, los reactivos químicos de calidad analítica se compraron en Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA).

Animales y diseño experimental

Los estudios se realizaron en ratas Wistar hembras obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A, con un peso inicial comprendido entre 140 y 160 g. Las ratas fueron alimentadas con Dieta 3 Rata / Ratón (Asociación Cooperativas Argentinas, División Nutrición Animal) y agua *ad-libitum*. Las condiciones ambientales consistieron en ciclos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, una temperatura de 20-24°C, y humedad entre el 65-75 %. El HCB se administró como una suspensión de 0,04 a 40 mg/ml de HCB en agua, previa disolución en Tween 20 (0,5 ml/100 ml). Luego de un periodo de aclimatación de 7 días se les administró HCB, 5 días por semana, por intubación gástrica, en concentraciones finales de 0,1; 1; 10; 100 y 500 mg/kg de peso corporal (p.c.), durante 30 días. Los grupos control recibieron iguales volúmenes de vehículo por la misma vía. El período de tiempo durante el cual se realizaron los tratamientos, fue elegido teniendo en cuenta trabajos previos de nuestro laboratorio en los que demostramos un valor máximo en la inducción de la enzima hepática hormono-tiroidea dependiente, enzima málica, después de 30 días de tratamiento con HCB (Kleiman de Pisarev et al., 1995), y una disminución en los niveles séricos de T₄ con la dosis de 500 mg/kg p.c. (Kleiman de Pisarev et al., 1989).

Las ratas fueron distribuidas de manera aleatoria en cinco grupos experimentales, los que recibieron el tratamiento de HCB en distintas concentraciones (0,1; 1; 10; 100 o 500 mg/ kg p.c.). El grupo control recibió el tratamiento con el vehículo.

El rango de dosis elegido se extiende desde valores que no producen efectos observables (NOEL) en la inducción de enzimas microsomales hepáticas en ratas Wistar (1 mg/kg p.c.) (den Tonkelaar & van Esch, 1974), hasta dosis que disminuyen los niveles séricos de T₄ (500 mg/kg p.c.) (Kleiman de Pisarev et al., 1989). En algunos experimentos se trataron las ratas con 10 mg de MMI en un volumen de 0,2 ml, administrado de manera intra-peritoneal (i.p.), 5 días por semana, durante los 30 días de tratamiento.

La salud general de los animales, evaluada por la observación del comportamiento y apariencia general, estado del pelaje, estado de la mucosa bucal, peso corporal e ingestión de agua y comida, no se vio afectada por ninguna de las dosis de HCB empleadas en el modelo experimental. El bajo orden de toxicidad del HCB es indicativo de su reducida absorción por el tracto intestinal, cuando se lo administra suspendido en medio acuoso (Koss y Koransky et al., 1975).

Luego de 30 días de tratamiento, y después de 12 h de ayuno, las ratas fueron pesadas, anestesiadas y se les extrajo muestras de sangre por punción cardiaca. Seguido a ello fueron sacrificadas, obteniéndose la glándula tiroidea y el hígado para llevar a cabo los distintos ensayos.

Se separó el suero de la sangre extraída por centrifugación a 3.000 x g durante 15 minutos, y se guardó a -20°C, donde permaneció hasta su análisis. Las tiroides destinadas a ensayos de Western blot fueron preservadas a -70°C hasta su procesamiento. Las tiroides destinadas a extracción de RNA para llevar a cabo la técnica de RT-PCR, fueron extirpadas utilizando material autoclavado libre de RNAsas e inmediatamente colocadas en el reactivo TRIZOL, homogeneizadas y guardadas a -70°C. Por último las tiroides destinadas a técnicas histológicas fueron fijadas en 10% formaldehído en buffer fosfato salino (PBS) frío (NaCl 0,8 % p/v, KCl 0,02 % p/v, KH₂PO₄ 0,02 % p/v, Na₂HPO₄.2H₂O 0,14 % p/v), para su posterior inclusión en parafina.

Parámetros bioquímicos

Las concentraciones totales de T₃ y T₄ en suero se determinaron por radioinmunoensayo (RIA) con la técnica de doble anticuerpo-PEG (Diagnostic Products Corporation). Los límites de detección fueron de 0,25 µg/dl, para T₄ total y 0,01 ng/dl para T₃ total. Cada muestra fue ensayada por duplicado. La determinación de la concentración sérica de TSH, se llevó a cabo también por RIA utilizando un kit específico y siguiendo el procedimiento para TSH de rata recomendado por la Nacional Pituitary Agency, USA (NIH, Bethesda, MD, USA).

Estudios inmunohistológicos y morfométricos de la glándula tiroides

Las glándulas tiroides destinadas para los estudios histológicos, fueron fijadas en 10 % formaldehído en PBS e incluidas en tacos de parafina. Se efectuaron cortes histológicos de aproximadamente 5 μm , los cuales fueron montados en portaobjetos polarizados, para la realización de distintas técnicas histológicas: a) tinciones con Ácido Periódico-Schiff (PAS) y hematoxilina-eosina (HE), para evaluar parámetros morfométricos, b) técnica de marcación *in situ* de los extremos 3'-OH del ADN fragmentado, TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated desoxyuridine triphosphate nick end-labeling), para evaluar apoptosis de células foliculares, y d) incorporación de 5³BrdU al ADN para evaluar proliferación celular.

- **Tratamiento de los cortes en blanco para la posterior realización de técnicas histológicas**

Los cortes histológicos de la glándula tiroides se desparafinaron con Xilol durante 5 minutos, de manera repetida. Luego se procedió a su hidratación incubándolos durante 10 minutos con alcohol en concentraciones decrecientes (100%, 96%, 90%, 70% v/v en agua). Posteriormente, los cortes fueron irradiados por microondas en buffer Citrato 10 mM, pH 6 durante 2 minutos, logrando de esta manera la recuperación antigénica. Luego fueron lavados con agua destilada dos veces durante 5 minutos e incubados durante 20 minutos con H₂O₂ 3% v/v para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas, que en el caso de la glándula tiroidea son muy activas, e impedir que las mismas interfieran con el revelado. Posteriormente se lavaron los cortes con PBS (pH 7,4) durante 10 minutos y se los incubó con solución de bloqueo [seroalbúmina bovina (BSA) 1 % en PBS conteniendo 0,3 % Triton X-100].

- **Histomorfología de la glándula tiroides**

Para la realización de los estudios morfométricos de la glándula se realizaron tinciones con HE y PAS. El análisis se llevó a cabo estimando el área coloidal y el espesor del epitelio folicular.

Para el estudio del área coloidal, se midieron en cada folículo el diámetro interno mayor (Lc) y menor (Wc) utilizando un analizador de imagen (Image - Pro Plus v4.5 -Media Cybernetics Inc.). El área del lumen folicular (coloide) fue calculada utilizando la siguiente fórmula: $A = \pi(Wc/2)(Lc/2)$ (Behrends et al., 2005). Se analizaron aproximadamente 200 folículos de cada uno de los cortes histológicos utilizando un microscopio óptico Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón). Para ello se realizó un barrido del corte a partir del centro del mismo en dirección a los ejes perpendiculares (x) e (y) (Figura 1). De esta manera se recorrió la sección histológica, tomando fotos del campo visual y midiendo los diámetros foliculares por

medio del analizador de imágenes. El criterio que se utilizó para el análisis, fue el de la medición del coloide de todos los folículos que aparecían enteros en la foto. Dicho estudio fue realizado sobre secciones de tiroides de ratas controles y ratas tratadas con las distintas dosis de HCB, el mismo análisis se efectuó sobre cortes histológicos del grupo de ratas tratadas con MMI.

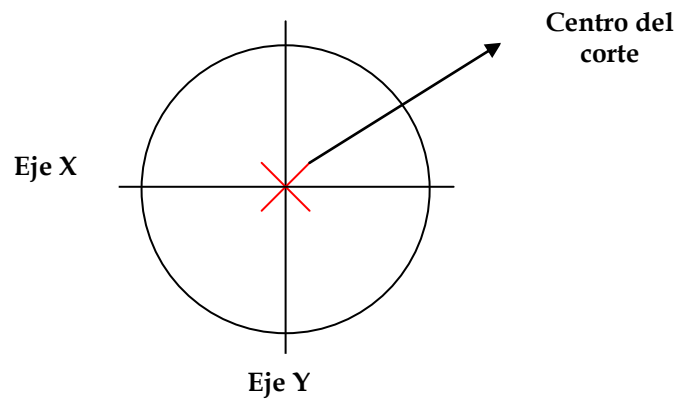
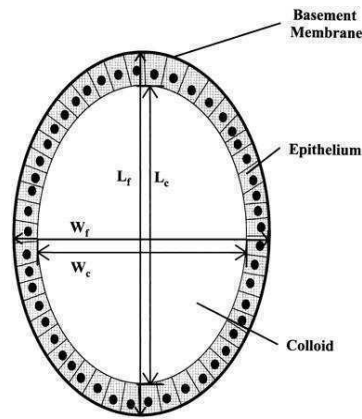


Figura 1: Barrido de la sección histológica

El espesor del epitelio folicular fue evaluado en los cortes con tinción de PAS, midiendo el diámetro interno mayor (L_c) y menor (W_c), y el diámetro externo mayor (L_f) y menor (W_f) de cada folículo (Figura 2). El espesor fue calculado como $(L_f - L_c) + (W_f - W_c) / 4$ (Wade et al., 2002)

La medición del volumen coloidal promedio, y del espesor folicular promedio de la glándula tiroides, nos provee información acerca de la función glandular, almacenamiento y secreción hormonal.



Extraído Wade et al., 2002

Figura 2: Diagrama de la estructura normal de un folículo tiroideo. Se muestran las mediciones tomadas para cada folículo evaluado.

- **Técnica de TUNEL**

Las células apoptóticas fueron detectadas mediante marcación *in situ* de los extremos 3'-OH libres por la técnica de TUNEL. Luego del desparafinado, los cortes fueron incubados a temperatura ambiente, durante 15 minutos con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para realizar una digestión del entorno proteico del ADN. Posteriormente se lavaron las secciones con agua destilada durante 2 minutos, y se procedió a la inhibición de las peroxidasas endógenas y posterior bloqueo como se detalló anteriormente.

Se adicionó digoxigenina 11-2'-dUTP a los extremos 3'-OH del ADN mediante la incubación con la enzima TdT, durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Luego se lavaron los cortes durante 15 segundos para detener la reacción, utilizando PBS frío y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con el mismo buffer. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 1 minuto con PBS, y se incubaron los cortes con el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa (horseradish peroxidase) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de realizar lavados con PBS, se reveló mediante la reacción de la enzima peroxidasa con el cromógeno DAB (DAB 0,1%, en buffer Tris, pH 7,6) y H_2O_2 0,02% el cual al reaccionar con la enzima modifica su conformación y produce un precipitado con una coloración marrón-rojiza. Se realizó además, una contra-tinción con verde de metilo, para teñir los núcleos.

Posteriormente se deshidrataron los cortes con butanol para luego realizar un montaje permanente, con Bálsamo de Canadá. Las secciones histológicas fueron evaluadas utilizando un microscopio óptico Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón).

El porcentaje de células positivas por la técnica de TUNEL fue estimado mediante el conteo de núcleos positivos sobre núcleos totales, de un total de 1.000 núcleos

aproximadamente. Para esto se utilizó el procesador de imágenes Image-Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics Inc). Como control positivo de la técnica se usaron cortes histológicos de glándula salival cancerígena de hámster. El control negativo fue la omisión de la enzima TdT en el ensayo.

- **Ensayo de proliferación celular**

Treinta minutos antes del sacrificio, se administró a las ratas una inyección i.p. de 5´BrdU en solución salina (0,08 mg 5´BrdU/g p.c.) para poder cuantificar la proliferación de las células foliculares tiroideas. La 5´BrdU se incorpora al ADN de células en fase S (síntesis y duplicación del material génico), de manera que por medio de un anticuerpo específico anti-5´BrdU, es posible evidenciar los núcleos proliferativos de las células foliculares.

Luego del desparafinado, recuperación antigénica inhibición de la peroxidasa endógena y bloqueo, detallados anteriormente, los cortes histológicos fueron incubados con el anticuerpo anti-5´BrdU (Biogenex, San Ramon, CA, USA) en una dilución 1:40, durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizaron lavados con PBS, y se incubaron los cortes con anticuerpo secundario biotinilado en una dilución 1:200 (antimouse Ig G; Kit Multilink, Biogenex). Finalmente, las secciones fueron incubadas con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Biogenex, San Ramon, CA, USA) y reveladas con DAB (DAB 0,1 % en buffer Tris pH 7,6) y H₂O₂ 0,02 %. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina como contra-color. El control negativo de la técnica se realizó por la omisión del anticuerpo primario.

Las secciones histológicas fueron evaluadas utilizando un microscopio óptico Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón). Los núcleos de las células foliculares marcados con 5´BrdU fueron cuantificados de manera sistemática utilizando el procesador de imágenes: Image-Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics Inc.). Se determinaron los índices de marcación con 5´BrdU como el porcentaje de núcleos marcados respecto del total, analizando entre 800 y 1.000 núcleos por corte.

Fraccionamiento subcelular

La glándula tiroidea fue homogeneizada en Buffer C (Sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,4), y centrifugada a 1.300 x g durante 10 minutos. Se guardó el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en el mismo buffer y se centrifugó nuevamente a 1.300 x g durante 10 minutos. Se juntaron ambos sobrenadantes y se centrifugaron a 14.000 x g durante 15 minutos obteniéndose así la fracción citosólica en el nuevo sobrenadante y la fracción mitocondrial en el precipitado, el cual fue resuspendido nuevamente en buffer C. Se

determinó la concentración proteica de cada una de las fracciones por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como proteína standard.

ESTUDIOS *in vitro*

Productos utilizados

El HCB (pureza mayor a 99%) fue adquirido de Aldrich-Chemie GmbH & Co (Steinheim, Alemania). El medio de cultivo DMEM (**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium) es de Gibco Products, y fue adquirido en Invitrogen Life Technology (Carlsbad, California, USA), el medio F-12 Coom's modificado, TSH, insulina, hidrocortisona, transferrina, somatostatina y acetato glicil-L-histidil-L-lisina fueron adquiridos de Sigma Aldrich-Chemie GmbH & Co (Steinheim, Alemania). El antibiótico-antimicótico, la tripsina y el medio DMEM alta concentración de glucosa, sin rojo fenol fueron comprados en PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria). El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Laboratorios Natocor (Córdoba, Argentina). Los inhibidores 4,7-ortofenantrolina (4,7 PHE), PD98059, SP600125, SB431542, SB203580 y el antioxidante TROLOX fueron adquiridos en Sigma Aldrich-Chemie GmbH & Co (Steinheim, Alemania). Las membranas de polivinil difluoruro (PVDF) se compraron en Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y el kit de quimioluminiscencia (ECL) fue adquirido de GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Los primers de TGF- β 1, catalasa, SOD1 y L-19 y el reactivo TRIZOL (Gibco Products), fueron obtenidos de Invitrogen Life Technology (Carlsbad, California, USA). Los reactivos necesarios para RT-PCR (oligonucleótidos random primers, dNTPs, RNAsin, GoTaq DNA polimerasa, M-MLV transcriptasa reversa) fueron adquiridos en Promega Corporation (Madison, WI, USA). La enzima TdT se obtuvo de Sigma Aldrich, Inc. (Saint Louis, MO, USA) y la mezcla de marcación para TUNEL, conteniendo los nucleótido con fluoresceína, se compró en Roche S.A (Buenos Aires, Argentina). El MTT y la DCHFDA fueron adquiridos en Sigma Aldrich-Chemie GmbH & Co (Steinheim, Alemania). El MitoTracker Red 580 fue adquirido en Molecular Probe (Eugene Oregon, USA). Por último, los reactivos químicos de calidad analítica se compraron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA), y el material estéril para cultivo celular en GBO Argentina.

Cultivo Celular

La línea celular FRTL-5 es una línea estable, inmortalizada, derivada de glándula tiroides normal de rata Fisher 344. Estas células, comparten un gran número de propiedades y características similares con tirocitos normales diferenciados. Poseen una morfología epitelial,

forman estructuras de tipo folicular, su crecimiento es dependiente de TSH y poseen numerosas funciones diferenciadas como captación de iodo y transcripción de genes específicos como el de tiroglobulina y tiroperoxidasa (Ambesi-Impimbato y Coon, 1979 y Ambesi-Impimbato y Villone, 1987).

Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM alta glucosa (50%) y F-12 Coom's modificado (50%), suplementado con TSH (10 mU/ml), insulina (10 µg/ml), hidrocortisona (10 nM), transferrina (5 µg/ml), somatostatina (10 ng/ml), acetato glicil-L-histidil-L-lisina (10 ng/ml), SFB (5%) y una mezcla de antibiótico-antimicótico (1%) (penicilina, 10,000 unidades/ml; sulfato de streptomina, 10mg/ml y amfotericina B, 25 µg/ml).

Las células, al 70-80% de confluencia, fueron tratadas con HCB disuelto en ETOH absoluto. La concentración final de ETOH para cada uno de los tratamientos fue de 0,5%. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces y los resultados mostrados son los más representativos.

Estudios tiempo y dosis respuesta

Las células FRTL-5 fueron sembradas en placas de 100 mm (1,5 x 10⁶ células) (para obtención de proteínas) o en placas de 6 pocillos (2,5 x 10⁵ células) (para extracción de RNA), con medio de cultivo completo, y se las dejó 24 horas para permitir que se adhirieran a las mismas. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo fue removido, se realizaron lavados con PBS y se les agregó medio de cultivo sin TSH, ni SFB. A las 24 horas las células fueron expuestas al HCB de acuerdo con el ensayo a realizar. Para los ensayos en función del tiempo, las células fueron tratadas con HCB (5 µM) o vehículo en medio completo, durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas. Para los ensayos en función de la dosis, las células fueron tratadas con HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 µM) o vehículo durante 6 u 8 horas, en medio completo. Luego de la exposición por los tiempos y dosis indicados, las células fueron lavadas con PBS, dos veces, y procesadas dependiendo de la técnica a realizar. Las dosis fueron elegidas de acuerdo a estudios previos de nuestro laboratorio, realizados en células de cáncer de mama (García et al., 2010) y considerando que están en el mismo rango de dosis encontradas en suero de humanos altamente expuestos al HCB (To-Figueras et al., 1997).

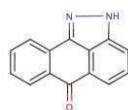
Ensayos con Inhibidores y Antioxidantes

Con el objetivo de determinar las vías de señalización involucradas en el mecanismo de acción del HCB, se testearon distintos inhibidores específicos.

Inhibidores:

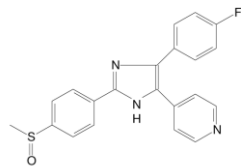
- **PD98059:** 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-one. Es un potente y selectivo inhibidor de la MAP quinasa quinasa (MEK1). Dicho compuesto, inhibe la fosforilación de ERK1/2, sin afectar su actividad intrínseca. El PD98059 se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con PD98059 o vehículo (DMSO 0,1%), durante 1 hora, y tratadas durante 8 y 24 horas con HCB 5 μM o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μM), y los tiempos de exposición fueron elegidos por su efectividad en estimular la fosforilación de ERK1/2, el clivaje proteolítico de la caspasa-3 (8 horas) y la pérdida de viabilidad celular (24 horas). Se testaron distintas concentraciones del inhibidor (10, 20 y 30 μM) con el objetivo de establecer la dosis para realizar los ensayos. Todas las concentraciones de PD98059 testeadas, lograron retornar los niveles de ERK1/2-P a sus niveles basales, de manera que se decidió utilizar la dosis de 10 μM .



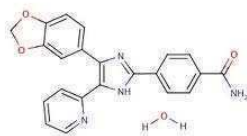
- **SP600125:** 1,9-pyrazoloantrone (Anthrapyrazolone). Es un inhibidor selectivo de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK1, 2, y 3). Se trata de un competidor reversible del ATP, inhibiendo, selectivamente, la actividad intrínseca de esta quinasa, afectando la fosforilación de c-Jun entre otros sustratos. El SP600125 se disuelve en DMSO.

Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con SP600125 o vehículo (DMSO 0,1%), durante 1 hora, y tratadas durante 8 y 24 horas con HCB 5 μM o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μM), y los tiempos de exposición fueron elegidos por su efectividad en estimular la actividad de JNK1, 2 y 3, (8 horas) y la pérdida de viabilidad celular (24 horas). Se testaron distintas concentraciones del inhibidor (25 y 50 μM) con el objetivo de establecer la dosis del mismo para realizar los ensayos. Se eligió la dosis de 50 μM de SP600125, la que logró retornar los niveles de c-Jun a sus niveles basales.



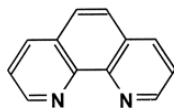
- **SB203580:** Es un compuesto del tipo pirimidilimidazol, que inhibe específicamente a p38 MAPK, sin afectar las actividades de las MAPKs JNK ni ERK1/2.

Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con SB203580 o vehículo (DMSO 0,1%), durante 1 hora, y tratadas durante 15 minutos y 24 horas con HCB 5 μ M o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μ M), y los tiempos de exposición fueron elegidos por su efectividad en estimular la actividad de p38 MAPK, (15 min) y pérdida de viabilidad celular (24 horas). Se testaron distintas concentraciones del inhibidor (10 y 15 μ M) con el objetivo de establecer la dosis del mismo para realizar los ensayos. Se eligió la dosis de 10 μ M de SB203580, que logró retornar los niveles de p38 a sus niveles basales.



- **SB431542:** Hidrato de benzamida 4-(5-Benzol[1,3]dioxol-5-il-4-pirldin-2-il-1H-imidazol-2-il). Es una pequeña molécula que inhibe de manera selectiva la quinasa del receptor tipo I de TGF- β 1 (ALK). SB431542 inhibe fundamentalmente la actividad de ALK 5, sin embargo también es capaz de inhibir la actividad de ALK 4 y 7, los cuales se encuentran altamente relacionados en sus dominios quinasa con ALK 5. El SB431542 se disuelve en DMSO.

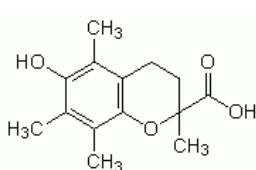
Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de SB431542 (0,25; 0,5; 0,75; y 1 μ M) o vehículo (DMSO 0,1%), durante 2 horas, y tratadas durante 24 horas con HCB 5 μ M o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μ M), y el tiempo de exposición fueron elegidos por su efectividad para inducir pérdida de viabilidad celular.



- **4,7 PHE (4,7-ortofenantrolina):** Antagonista del AhR, no relacionado estructuralmente. El 4,7 PHE se disuelve en DMSO.

Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de 4,7 PHE (5, 10, 20 y 30 μM) o vehículo (DMSO 0,1%), durante 2 horas, y tratadas durante 24 horas con HCB 5 μM o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μM), y el tiempo de exposición fueron elegidos por su efectividad para inducir la pérdida de viabilidad celular.

Antioxidante:



- **TROLOX:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico. Secuestrador de ROS. El TROLOX se disuelve en ETOH.

Las células FRTL-5 fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de TROLOX (100 y 200 μM) o vehículo (ETOH 0,1%), durante 30 minutos y tratadas durante 24 horas con HCB 5 μM o vehículo, en presencia del inhibidor. La dosis de HCB (5 μM), y el tiempo de exposición fueron elegidos por su efectividad para inducir la pérdida de viabilidad celular.

Obtención de proteínas para Western blot

Una vez terminados los tratamientos correspondiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío y escrapeadas en hielo con 100 μl de Buffer de lisis A [TRITON-X100 0,5%, NaCl 0,15 M, Tris-HCl pH 7,4 20 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, FNa 50 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 2 mM, junto con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (aprotinina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 120 μM y pepstatina 12 μM)].

Los lisados celulares fueron centrifugados a 16.000 x g durante 10 minutos con el objetivo de precipitar y retirar el ADN genómico. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -80°C.

Las concentraciones proteicas se determinaron por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como proteína standard.

Fraccionamiento subcelular

Una vez terminados los tratamientos correspondientes, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío y resuspendidas en 5 volúmenes de Buffer de lisis B [Hepes-KOH 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, pH 7,5, junto con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (aprotinina 20 µg/ml, leupeptina 120 µM y pepstatina 12 µM)]. Las muestras fueron homogeneizadas en frío, por medio de 10 strokes en homogeneizador de tefllon y centrifugadas a 750 x g (4°C) durante 10 minutos dos veces. Los precipitados nucleares fueron lisados con buffer de lisis A. Los sobrenadantes fueron sometidos a una nueva centrifugación a 10.000 x g (4°C) durante 15 minutos. Se obtuvo de esta manera un precipitado de mitocondrias y un sobrenadante conteniendo la fracción post-mitocondrial, la cual fue sometida a centrifugación a 100.000 x g (4 °C) durante 1 hora, para obtener finalmente la fracción citosólica. Las muestras fueron mantenidas a -80°C.

Se determinó la concentración proteica de cada una de las fracciones por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como proteína standard.

Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar el efecto del HCB sobre la viabilidad celular, se realizó el ensayo de MTT que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) de color amarillo, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán) (Figura 3). La cantidad de células vivas y metabólicamente activas, es proporcional a la cantidad de formazán producido. Brevemente, las células FRLT-5 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (6×10^3 células), con medio de cultivo completo. Luego de su adhesión a las 24 horas, el medio fue removido y se les agregó medio sin SFB ni TSH. Finalmente, se las trató con distintas concentraciones de HCB (0,005; 0,05; 0,5; 5 µM) en medio completo durante distintos tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas). Una vez transcurrido el ensayo, las células fueron incubadas con MTT (0,5 mg/ml) en medio DMEM sin rojo fenol, durante una hora a 37°C. Los cristales de formazán fueron disueltos con 100 µl de DMSO y se realizaron las lecturas fotocolorimétricas a una longitud de onda de 570 nm, en un lector de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Inc., USA). La colección y el análisis de los datos se llevaron a cabo con el software Gen5 (Biotek Instruments, Inc., USA).

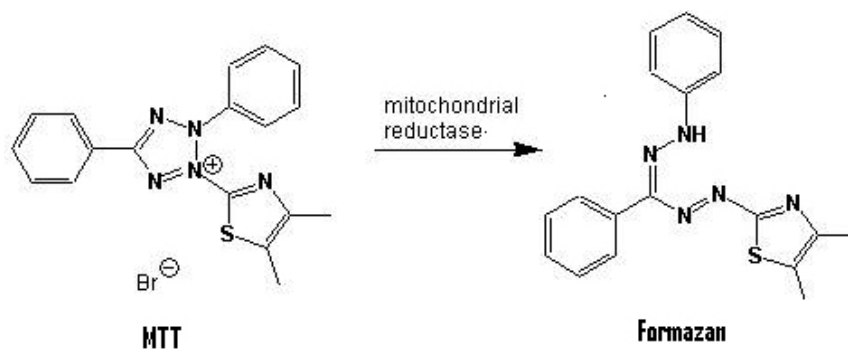


Figura 3: Reducción del MTT a Formazán

Tinción con Hoechst

Células FRTL-5 sembradas sobre vidrios cubreobjetos, fueron tratadas durante 8 y 24 horas con HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) en medio de cultivo completo. Una vez finalizado el tratamiento se las fijó con ETOH 70% frío, durante 15 minutos y se las incubó con Hoechst (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron montadas en portaobjetos con líquido de montaje para fluorescencia. La morfología nuclear fue examinada en un microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón). Las células apoptóticas fueron observadas con un aumento de 400X y se tomaron fotos con una cámara CoolSNAP-Pro cf Color, acoplada al microscopio. Las mismas fueron analizadas con el software Image-Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics Inc.). Se determinó el porcentaje de células con núcleos con morfología apoptótica, en cada grupo experimental.

Ensayo de TUNEL

Las células apoptóticas fueron detectadas mediante marcación *in situ* de los extremos 3'-OH libres del ADN fragmentado, por la técnica de TUNEL. Brevemente, una vez terminado los tratamientos, las células FRTL-5 sembradas sobre vidrios cubreobjetos, fueron lavadas con PBS y fijadas con ETOH 70% frío. Luego de su fijación, fueron lavadas nuevamente con PBS e incubadas con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en TRIS-HCl 10 mM pH7,4), durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con un buffer conteniendo TRITON X-100 0,1 %, Citrato de Sodio 0,1% en PBS, durante 8 minutos e incubadas posteriormente, durante 10 minutos a temperatura ambiente, con buffer de equilibrio [Cacodilato de Potasio 200 mM (pH 6,6), TRIS-HCl 25 mM (pH 6,6), DTT 0,2 mM, BSA 025 mg/ml y Cloruro de Cobalto 2,5 mM]. Posteriormente, se realizó la incubación con buffer de reacción, durante 60 minutos a 37°C en oscuridad. El buffer de reacción contiene la enzima TdT, dNTPs y dUTPs marcados con fluoresceína (TUNEL label mix - Roche). Una vez

transcurrido el tiempo de reacción las células fueron lavadas 3 veces con PBS, incubadas con Hoechst (5 µg/ml en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente y montadas en portaobjetos con líquido de montaje para fluorescencia. Las mismas fueron observadas al microscópico óptico de fluorescencia Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón) con un aumento de 600X y se tomaron fotos con una cámara CoolSNAP-Pro cf Color, acoplada al microscopio. Las fotografías fueron analizadas con el software Image-Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics Inc.).

Morfología Mitocondrial

Células FRTL-5 sembradas sobre vidrios cubreobjetos, fueron tratadas durante 6 horas con HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 µM) en medio de cultivo completo. Una vez finalizados los tratamientos, las células fueron incubadas durante 30 minutos en oscuridad con MitoTracker Red 580 (50 nM) en medio DMEM sin rojo fenol. Transcurridos los 30 minutos, las células fueron lavadas con PBS, 2 veces y fijadas con paraformaldehído 4% frío, durante 15 minutos. Finalmente las células fueron incubadas con Hoechst, durante 10 minutos, para teñir los núcleos y montadas con líquido de montaje para fluorescencia, en vidrios portaobjetos para su análisis en el microscopio microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX50 F-3 (Olympus Optical Co, LTD, Japón). Las células fueron observadas con un aumento de 1000X y se tomaron fotos con una cámara CoolSNAP-Pro cf Color, acoplada al microscopio. Las mismas fueron analizadas con el software Image-Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics Inc.). Se determinó el porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas en cada grupo experimental.

Medición de los niveles intracelulares de ROS

Los niveles intracelulares de ROS fueron medidos mediante la determinación de la concentración de H₂O₂ con la sonda 2',7'-di-clorodihidrofluoresceína diacetato (DCHFDA). El DCHFDA (excitación 485 nm/emisión 528 nm) atraviesa la membrana celular. Una vez dentro de la célula el grupo acetato del DCHFDA es hidrolizado por esterasas intracelulares convirtiéndolo en 2',7'-di-clorodihidrofluoresceína (DCHF). Dicho compuesto es polar y queda atrapado dentro de la célula. El DCHF fluoresce cuando es oxidado por H₂O₂ o peróxidos lipídicos resultando en la formación de 2',7'-di-clorofluoresceína (DCF). Los niveles de DCF producidos dentro de la célula son proporcionales la cantidad de peróxido producido.

Las células FRTL-5 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (6 x 10³ células), y se las dejó con medio completo durante 24 horas para permitir su adhesión. Luego, se les retiró el medio y se las incubó con medio de cultivo sin SFB ni TSH durante 24 horas. Antes de iniciar los tratamientos, las células fueron cargadas con DCHFDA (10 µM) en medio completo durante 30 minutos, a 37°C, en oscuridad. Una vez transcurridos los 30 minutos se realizaron lavados

con PBS, para eliminar toda la DCHFDA, que no hubiera sido captada por la célula. Los tratamientos se realizaron en DMEM sin rojo fenol, durante los tiempos indicados (2, 3, 4 y 5 horas) con HCB 0,005; 0,05; 0,5; 5 μ M. Luego del tratamiento, se registró la intensidad de la fluorescencia de DCF, en un lector de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Inc., USA). La colección y el análisis de los datos se llevaron a cabo con el software Gen5 (Biotek Instruments, Inc., USA). Se realizaron controles de fluorescencia del plástico, del medio DMEM sin rojo fenol, de la autofluorescencia de las células sin DCHFDA en medio DMEM sólo, o con HCB o ETOH, y por último la fluorescencia de las células cargadas con DCHFDA sin tratamiento.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células FRTL-5 fueron sembradas en placas de 100 mm ($1,5 \times 10^6$ células) en medio completo, durante 24 horas para permitir su adhesión. Luego, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio sin TSH, ni SFB. 24 horas después las células fueron tratadas con HCB 5 μ M, durante 24 y 72 horas. Finalizados los tratamientos se las incubó con tripsina para despegarlas de la placa y luego de inhibir su actividad se las centrifugó a 1.100 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 100 μ l de PBS y luego las células fueron fijadas con 1 ml de ETOH 70% frío y conservadas a -20°C . Las células fijadas fueron centrifugadas a 1.100 rpm y el precipitado fue resuspendido e incubado a 37°C durante 30 minutos, en 300 μ l de solución RNAsa (0,2 mg/ml en PBS). Una vez terminada la incubación las células fueron resuspendidas en 6 μ l de ioduro de propidio (IP) (50 μ g/ml), vortexeadas y conservadas en oscuridad a 4°C . El contenido de ADN fue evaluado utilizando un citómetro de flujo (CyFlow Pas III, Partec; Görlitz, Deutschland, Alemania). Al menos 10.000 células fueron evaluadas en cada análisis. Los datos fueron analizados usando el software Cylchred 1.0.2 (Cardiff University, UK).

TÉCNICAS GENERALES

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas citosólicas y nucleares (50 μ g) obtenidas de las células FRTL-5 y de tiroides de las ratas, se resuspendieron en buffer de carga (Tris-HCl 1 M, pH 6,8, SDS 8%, glicerol 40 %, β -mercaptoetanol 20 %, azul de bromofenol) y se calentaron a 100°C durante 5 min. Las mismas se sembraron y separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10-12 % de acuerdo a la técnica de Laemmli

(1970), utilizando una cuba Mini-protean II (Bio Rad). La corrida se realizó a un voltaje constante de 120 V durante 60-90 minutos aproximadamente. Se usó como buffer de corrida Tris-HCl 25 mM, pH 6,8, Glicina 0,32 M y SDS 0,1% p/v. Se utilizaron proteínas marcadoras de peso molecular que se corrieron junto con las muestras.

Western blot

Una vez realizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF, en un sistema semi-seco utilizando un dispositivo de transferencia (Mini Protean Trans Blot, Bio-Rad), durante 1,5 horas a 18 V. Posteriormente se bloquearon con solución de bloqueo de leche en polvo descremada 5 % p/v y BSA 2,5 % p/v en TBST (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 150 mM y Tween 20 0,05 % v/v) durante toda la noche a 4 °C. Seguidamente se las incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 1), también durante toda la noche a 4 °C. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas 5 veces durante 10 minutos cada lavado, con TBST para quitar el exceso de anticuerpo primario y se las incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugados con peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con TBST, y 1 lavado con TBS, durante 10 minutos cada uno. El revelado se realizó utilizando un kit de luminiscencia (ECL, Amersham Biosciences, Inc., UK). Se cuantificaron las autorradiografías por densitometría láser usando en un equipo Fotodyne (Foto/Analyst), y un analizador de imágenes Gel-Pro Analyzer 3.1.

| Anticuerpo contra | Tipo | Marca | Origen | Dilución | PM (KDa) |
|-------------------------------------|------------|----------------------------------|-------------------|----------|----------|
| AIF | primario | Abcam | Rabbit policlonal | 1/500 | 67 |
| Anti-Goat (HRP- conjugated) | secundario | Santa Cruz Biotechnology | Donkey | 1/2000 | - |
| Anti-Mouse (HRP- conjugated) | secundario | BIO RAD | Goat | 1/1000 | - |
| Anti-Rabbit (HRP- conjugated) | secundario | BIO RAD | Goat | 1/1000 | - |
| Caspasa-3 clivada | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 17 |
| Caspasa-8 p18 | primario | Santa Cruz Biotechnology | Mouse monoclonal | 1/500 | 20 |
| Caspasa-9 | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 17 |
| Caspasa-10 FL | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 63/66 |
| Ciclina D1 | primario | Abcam | Mouse monoclonal | 1/500 | 36 |
| Citocromo c | primario | BD Pharmingen | Mouse monoclonal | 1/500 | 15 |
| p27 | primario | Sigma Aldrich | Mouse monoclonal | 1/300 | 27 |
| p38 MAPK | primario | Cell Signaling | Mouse monoclonal | 1/500 | 43 |
| p44/42 MAPK | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/1000 | 42/44 |
| PCNA | primario | Dako Cytomation | Mouse monoclonal | 1/2000 | 36 |
| phospho-c-jun (Ser 63/73) | primario | Santa Cruz Biotechnology | Goat policlonal | 1/500 | 39 |
| phospho-p38 MAPK | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 43 |
| phospho-p44/44 MAPK (Thr202/Tyr204) | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/1000 | 44/42 |
| phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 46/54 |
| SAPK/JNK | primario | Cell Signaling | Rabbit policlonal | 1/500 | 46/54 |
| TG | primario | Obsequio Lab. Dr. Pisarev (CNEA) | Rabbit policlonal | 1/1000 | 330 |
| β -Actina | primario | Abcam | Mouse monoclonal | 1/2000 | 42 |

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en la técnica de Western blot

Extracción de RNA

Para realizar la extracción de RNA, la glándula tiroides se homogenizó en una solución de TRIZOL, en una relación de 1 ml/100 mg de tejido. Las células FRLT-5, en cambio, fueron resuspendidas en 500 μ l de TRIZOL. El RNA total se extrajo por el método de Chomczynski y Sacchi (1987).

Las muestras se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se les agregó 0,2 ml de cloroformo/ml de TRIZOL utilizado durante la homogeneización. Luego de una vigorosa agitación durante 15 segundos y separación de las fases acuosa y orgánica, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó isopropanol (0,5 ml/ml de TRIZOL) para precipitar el RNA. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 12.000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Los precipitados, de RNA, se lavaron dos veces con ETOH 75 % y se resuspendieron en agua destilada autoclavada. La concentración y pureza del RNA se midió por absorbancia a 260 nm y por el cociente de absorbancias a 260 nm / 280 nm respectivamente, en un espectrofotómetro.

RT-PCR

La síntesis del cDNA a partir del RNA se realizó por medio de un kit de síntesis (Promega Corporation, USA). El mismo contenía, el buffer de reacción, inhibidores de RNAsas (RNasin), los dNTPs y la enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT) con su buffer específico (M-MLV Reaction Buffer). La reacción se inició a partir de 2 µg de RNA total. Antes de iniciar la reacción de transcripción reversa, el RNA junto con los random primers (0,1 µg/µl) fueron incubados, en un baño a 70°C durante 5 minutos. Dicho paso tiene por objeto eliminar las estructuras tridimensionales que haya adquirido el RNA, y favorecer el pegado de los primers. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiraron los tubos del baño y se los colocó rápidamente en hielo. Se les agregó la mezcla de reacción, que incluía el buffer de reacción, inhibidores de RNAsas (Recombinant RNasin, 25 Unidades), los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM) y la enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT, 200 Unidades), y se los incubó durante 1 hora a 37°C.

La PCR se realizó amplificando 1 µl de cDNA en un volumen de reacción final de 100 µl, utilizando la enzima GoTaq polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega). Se amplificó el cDNA usando primers específicos para TGF-β1, catalasa y SOD así como para los controles de carga GAPDH y L-19.

- **Primers utilizados**

Las secuencias de primers utilizadas para las amplificaciones por PCR fueron:

Primer Forward TGF-β1: 5'-CTGCTGGCAATAGCTTCCTA-3'.

Primer Reverse TGF-β1: 5'-CGAGCCTTAGTTGGACAGGAT-3'.

Primer Foward CAT: 5'-AGACTCACCTGAAGGATCCTG-3'.

Primer Reverse CAT: 5'-GACAGTTCACAGGTATCTGCA-3'.

Primer Foward SOD1: 5'-GCTGAAGGGCGACGGTCCGGT-3'

Primer Reverse SOD1: 5'-TCTTGTTTCTCGTGGACCACC-3'

Primer Foward L-19: 5'-GAAATCGCCAATGCCACCTC-3'

Primer Reverse L-19: 5'TCTTAGACCTGCGAGCCTCA-3'

Primer Forward GAPDH: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'

Primer Reverse GAPDH: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

- **Reacciones de amplificación de TGF-β1, catalasa, SOD1, L-19 y GAPDH**

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador para PCR (T-18 Ivema Desarrollos). La cantidad de ciclos de amplificación utilizada en cada caso, fue puesta a punto, realizando curvas de ciclos de 10, 20, 30 y 40 ciclos.

La reacción para la amplificación de TGF- β 1, de tiroides de rata, constó de 40 ciclos: 1 minuto a 94°C (temperatura de desnaturalización), 1 minuto a 60°C (temperatura de annealing) y 1 minuto a 72°C (temperatura de elongación de la Taq polimerasa). La reacción de amplificación de GAPDH constó de 27 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C.

La reacción de amplificación de TGF- β 1, de las células FRLT-5, constó de 26 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C.

La reacción de amplificación de la proteína ribosomal L-19 constó de 25 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C.

La reacción de amplificación de catalasa constó de 40 ciclos: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C.

La reacción de amplificación de SOD1 constó de 25 ciclos: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C.

Antes de la iniciación de los ciclos se realizó una fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y luego de los mismos, la reacción concluyó con una fase final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 2% p/v con bromuro de etidio, 0,05% v/v. Las bandas fueron visualizadas en un equipo Image Quant RT ECL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) acoplado a un software para su análisis, Image Analysis Software, Image Quant TL 7,0 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Los experimentos se repitieron tres veces y cada muestra fue sembrada por duplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos fueron expresados en valores medios \pm SEM. El estudio de los mismos se llevó a cabo mediante un análisis de varianzas del tipo ANOVA de uno y dos factores. Antes de realizar dicho análisis se realizó una prueba de Bartlett, de homogeneidad de varianzas, y una prueba de Lilliefors para corroborar que cada serie de datos se ajustara a una distribución normal.

Cuando el análisis de varianzas resultaba significativo ($p < 0.05$), se utilizó un post-test de contrastes, test de Tukey o test de Bonferroni, para contrastar diferencias entre grupos experimentales.

RESULTADOS



CAPITULO I

Modelo *in vivo* Ratas Wistar Hembras

I.1. Efecto del HCB sobre el estatus tiroideo

La evaluación de parámetros histológicos de la glándula tiroides, junto con la determinación de los niveles séricos hormonales, comprenden importantes criterios de valoración del estatus tiroideo.

Se evaluaron las concentraciones hormonales en suero de T₄, T₃ y TSH, el área coloidal, el espesor del epitelio folicular y el peso de la glándula en ratas hembras Wistar tratadas con distintas concentraciones de HCB (1, 10, 100 y 500 mg/kg p.c.) durante 30 días.

I.1.a. Niveles hormonales séricos

Estudios en función de la dosis de HCB mostraron que sólo la mayor dosis del plaguicida (500 mg/kg p.c) administrada durante 30 días, produjo una reducción del 40%, en los niveles de T₄ total. Por el contrario, los niveles de T₃ y de TSH, y el peso tiroideo relativo [**PT/PC**: peso de la tiroides (mg) / peso corporal (g) × 100] no fueron modificados por el tratamiento con HCB, en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Como control positivo del funcionamiento del eje hipófisis-tiroideo, se trataron las ratas, con un compuesto bociogénico inhibidor de la tiroperoxidasa, MMI (10 mg/día/rata), y se midieron los niveles de TSH. Como esperábamos, los niveles séricos de TSH, así como el peso tiroideo relativo aumentaron significativamente (TSH: 150 % PT/PC: 130 %) (Tabla 1).

Tabla 1: Dosis respuesta de los niveles séricos de T₄ total, T₃ y TSH, y el PT/PC, por el tratamiento con HCB.

| | T ₄ (µg/dl) | T ₃ (ng/dl) | TSH (ng/ml) | PT/PC |
|----------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------|
| CONTROL | 3.67 ± 0.52 | 77.00 ± 5.00 | 1.83 ± 0.27 | 8.16 ± 0.30 |
| HCB 1 | 3.55 ± 0.43 | 69.00 ± 7.00 | 2.01 ± 0.32 | 8.90 ± 0.45 |
| HCB 10 | 3.88 ± 0.36 | 75.00 ± 3.00 | 2.08 ± 0.42 | 8.59 ± 0.48 |
| HCB 100 | 3.32 ± 0.29 | 66.00 ± 5.00 | 1.89 ± 0.36 | 9.06 ± 0.52 |
| HCB 500 | 2.21 ± 0.19 * | 73.00 ± 6.00 | 1.93 ± 0.29 | 8.96 ± 0.41 |
| MMI | ND | ND | 4.65 ± 0.17 * | 18.6 ± 0.75 * |

Tabla 1: Efecto de la administración de HCB (1, 10, 100 y 500 mg/kg p.c.) sobre los niveles séricos de T₄ total, T₃ y TSH, y el peso tiroideo relativo, medido luego de 30 días de administración. Los valores representan las medias ± SEM (n=4). PT/PC: [peso de la tiroides (mg) / peso corporal (g)] × 100. ND: No Determinado. * Significativamente diferentes respecto del grupo control (p<0,05). Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

1.1.b. Histomorfología de la glándula tiroides

Las medidas histomorfométricas son de gran utilidad en la caracterización de respuestas a tóxicos que producen múltiples efectos endócrinos (den Tonkelaar & van Esch et al., 1974).

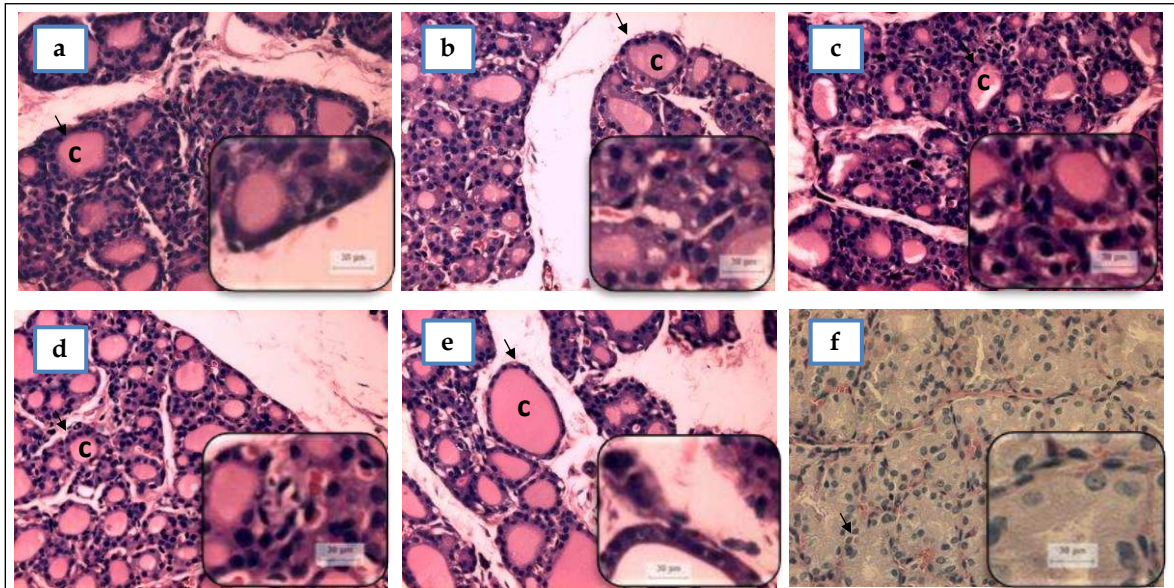
Se evaluaron parámetros histomorfológicos, analizando el área coloidal y el espesor del epitelio folicular de cortes histológicos teñidos con PAS, de las ratas control y tratadas con distintas dosis de HCB.

Los resultados demostraron que las glándulas tiroides de ratas pertenecientes al grupo control presentaban una arquitectura glandular normal. Los folículos ovalados de tamaño variado, contenían un coloide de color uniforme, rodeados de un epitelio cuboidal ordenado de células foliculares (Figura 1Aa). Los folículos de mayor tamaño se localizaban principalmente en los bordes externos de la glándula, y los de menor tamaño en el centro de la misma.

En cambio, las tiroides de las ratas tratadas con HCB (500 mg/kg p.c.), presentaban un aumento del área coloidal (151 %), y una disminución del espesor del epitelio folicular (55 %) (Figura 1Ae y B). Dado, que el tamaño de los folículos, depende fundamentalmente del número de células y de la cantidad de coloide acumulado, que varían, de acuerdo a la actividad glandular, las alteraciones observadas, sugerían una marcada hipofunción glandular.

El grupo de ratas tratadas con MMI (10 mg/día/rata) durante 30 días, presentaba una gran hipertrofia de células foliculares organizadas en un epitelio cúbico columnar y una ausencia casi total de coloide, de apariencia irregular (Figura 1A a y f).

A



B

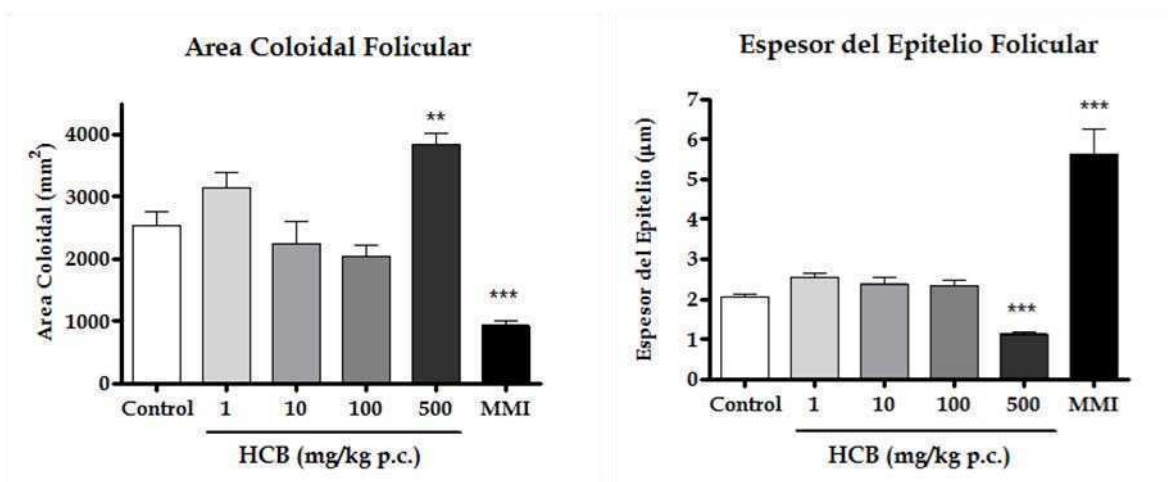


Figura 1: Histomorfología de la glándula tiroides. (A) Fotos de cortes histológicos representativos de tiroides de ratas tratadas durante 30 días con HCB o MMI: a: CONTROL, b: HCB 1 mg/kg p.c., c: HCB 10 mg/kg p.c., d: HCB 100 mg/kg p.c., e: HCB 500 mg/kg p.c. y f: MMI. Los coloides dentro del lumen folicular están marcados con la letra "c". Las flechas señalan el epitelio folicular. Barra: 30 µm. Aumento 400X. **(B)** Cuantificaciones del área coloidal y el espesor del epitelio folicular. Los valores representan la media ± SEM de 200 folículos de tres ratas por grupo. ** p<0,01 y *** p<0,001, significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para

identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales. Los experimentos fueron repetidos dos veces con resultados similares.

I.2. El HCB induce incrementos en los niveles de expresión de TGF- β 1

El HCB es un inductor de la actividad de la T₄-UDPGT1 hepática (Alvarez et al., 2005). Se ha reportado que ciertos compuestos inductores de dicha enzima aumentan la expresión del TGF- β 1 y la apoptosis en tiroides de rata (Kolaja et al., 1999). Basados en estos antecedentes, se evaluó la capacidad del HCB de inducir la expresión del gen de TGF- β 1. Para esto se realizó la medición, por la técnica de RT-PCR, de los niveles del mRNA de TGF- β 1 en tiroides de ratas control y tratadas con distintas dosis de HCB (1, 10, y 100 mg/kg p.c.), durante 30 días. La dosis de 500 mg/kg p.c., no fue incluida en éste y los subsiguientes análisis, con el propósito de excluir las dosis de HCB que alteran la economía tiroidea, y analizar sólo los efectos del tóxico que son independientes de la disrupción endócrina.

Los resultados demostraron un aumento significativo en los niveles de mRNA de TGF- β 1, en tiroides de ratas tratadas con todas las dosis ensayadas (Figura 2). En función de los resultados, se decidió evaluar una dosis menor (0,1 mg/kg p.c.) para hallar una concentración de HCB que no aumentara la expresión del TGF- β 1 (dosis donde no hay efecto observable, NOEL). Dicha dosis fue incluida en los estudios posteriores.

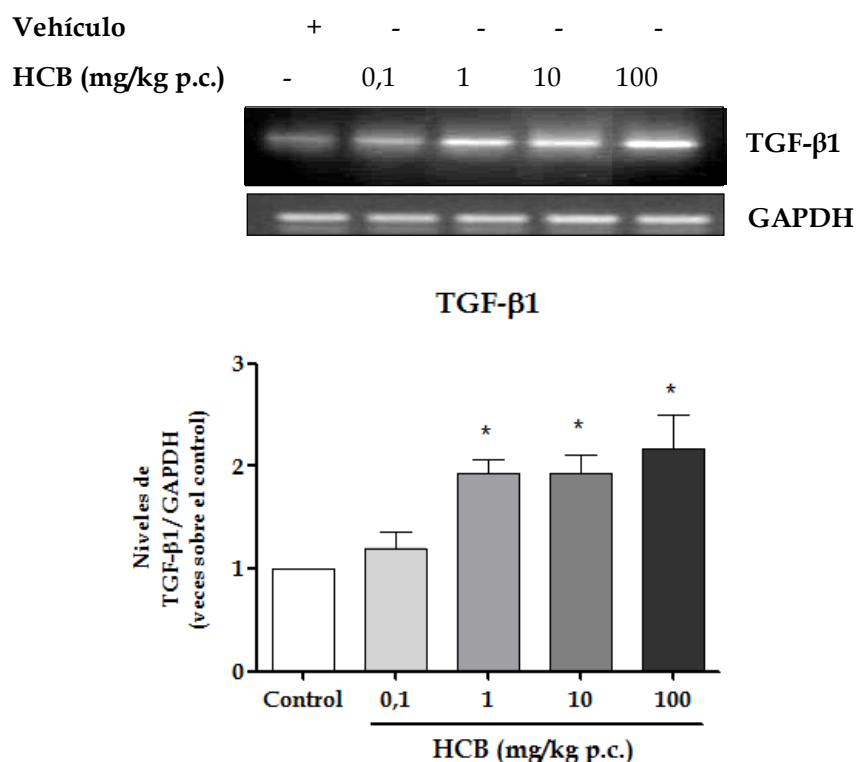


Figura 2: Niveles de expresión del gen de TGF-β1. Las ratas fueron tratadas con HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) durante 30 días. Los niveles de expresión del TGF-β1 fueron evaluados por la técnica de RT-PCR, a partir del cDNA sintetizado del RNA total de tiroides de las ratas de cada grupo. GAPDH fue utilizado como control de carga. Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas de las fotografías obtenidas de los geles teñidos con bromuro de etidio. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a GAPDH y normalizadas al control. Los valores representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. * $p < 0,05$ significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

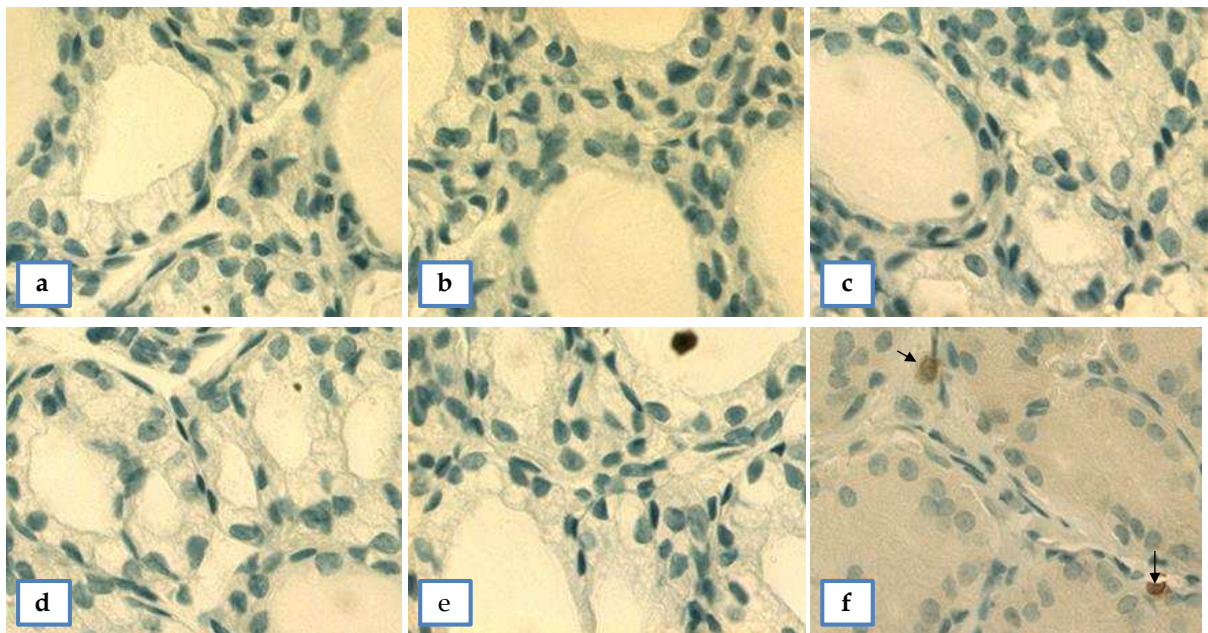
I.3. El HCB no altera la proliferación celular tiroidea

Con el objetivo de estudiar el efecto del HCB sobre la proliferación de las células foliculares tiroideas, se evaluó la incorporación de 5'BrdU al ADN de células replicativas y la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), sintetizado en la fase G₁ temprana y S del ciclo celular. Se trataron las ratas durante 30 días con HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.).

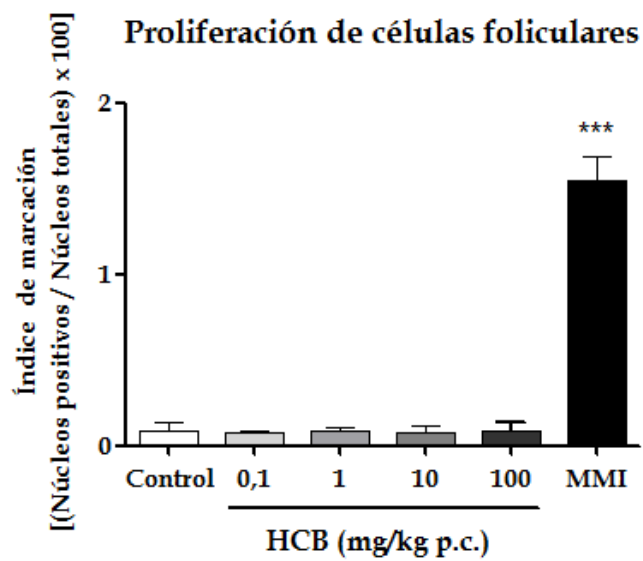
Los resultados demostraron que el índice de marcación celular [(núcleos marcados positivamente/núcleos totales) \times 100], no se modificó respecto del control para ninguna de las dosis de HCB ensayadas (Figura 3 A y B), demostrando que el HCB, no altera la proliferación de células foliculares tiroideas. Estos resultados fueron corroborados a través de la inmunodetección de PCNA, por la técnica de Western blot (Figura 3 C).

Como control positivo un grupo de ratas fue tratado con MMI (10 mg/rata) durante 30 días. De acuerdo a lo esperado, el MMI provocó un marcado aumento de la proliferación celular (Figura 3Af y B). Este aumento se manifestó con un agrandamiento (130 %) de la glándula y un aumento de la relación PT/PC (C: 8.16 ± 0.30 ; MMI: 18.6 ± 0.75) como se muestra en la Tabla 1.

A



B



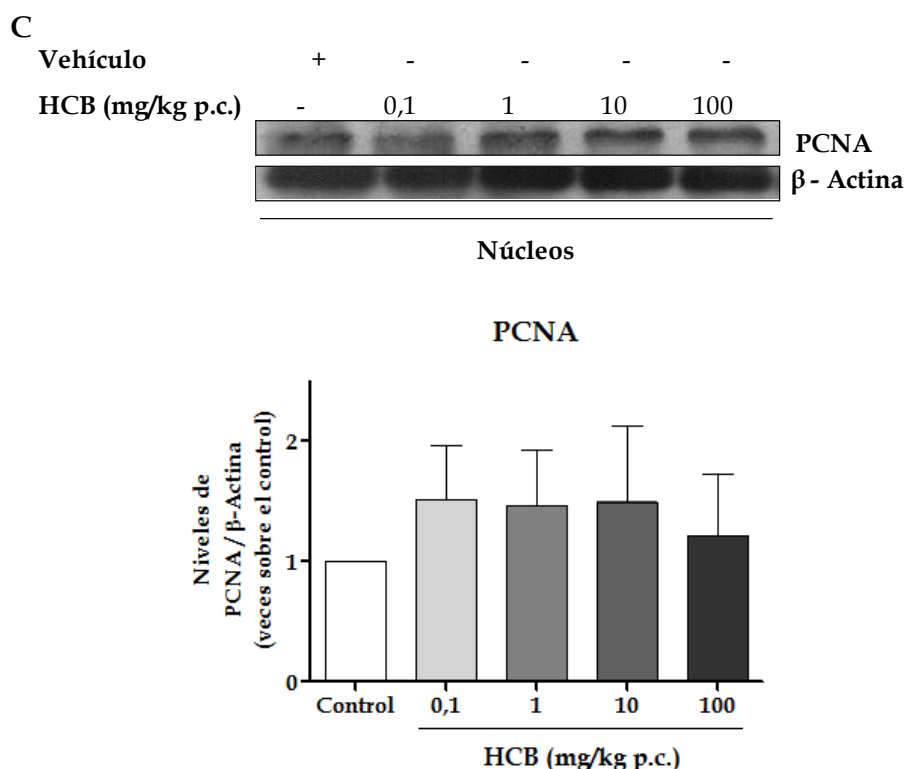


Figura 3: Efecto del HCB sobre la proliferación de células foliculares tiroideas. La proliferación celular fue evaluada por la incorporación de 5'BrdU al DNA de células replicativas y los niveles proteicos de PCNA. **(A)** Fotografías representativas de cortes histológicos de tiroides de ratas a: Control; b: HCB 0,1 mg/kg p.c.; c: HCB 1 mg/kg p.c.; d: HCB 10 mg/kg p.c.; e: HCB 100 mg/kg p.c.; f: MMI. Las células positivas están indicadas con flechas. Aumento 400X. **(B)** Cuantificación. Índice de marcación: [(número de núcleos positivos/número de núcleos totales) \times 100]. **(C)** Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de PCNA y β -Actina nuclear. Los valores representan las medias \pm SEM (n=1000 núcleos por rata) de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. *** p<0,001 significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

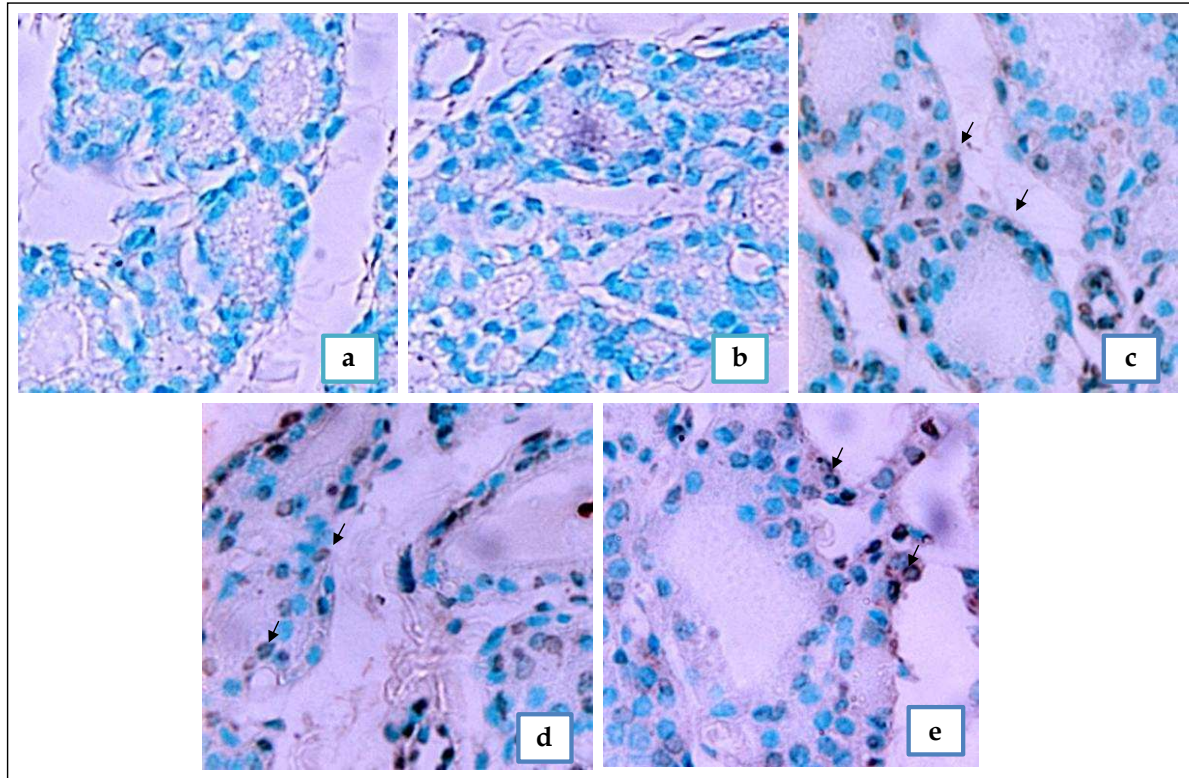
I.4. El HCB induce apoptosis de células foliculares tiroideas

El TGF- β 1, es una citoquina que regula el crecimiento y la función de la glándula tiroides. Dado que se ha demostrado que esta citoquina induce apoptosis en diversos tipos celulares (Chen et al., 2002), se evaluó el efecto del HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) sobre la apoptosis de células foliculares tiroideas, ensayando la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL, en tiroides de ratas.

Los resultados, en primera instancia, demostraron que la apoptosis es un evento raramente encontrado en la tiroides de ratas controles (< 4%) (Figura 4). Además se observó que el tratamiento con HCB (1, 10 y 100 mg/kg p.c) aumentó de manera significativa (450, 375 y 200 % respectivamente) la incidencia de apoptosis en las células foliculares de la glándula tiroides. Si bien estos resultados demuestran que las células foliculares tiroideas son sensibles a la apoptosis inducida por el HCB en todas las dosis ensayadas, el efecto apoptótico es menos pronunciado a la dosis de 100 mg/kg p.c.

Debe señalarse, que la apoptosis es un proceso que no involucra la totalidad de las células de un folículo, sino que se da sólo en algunas células del mismo.

A



B

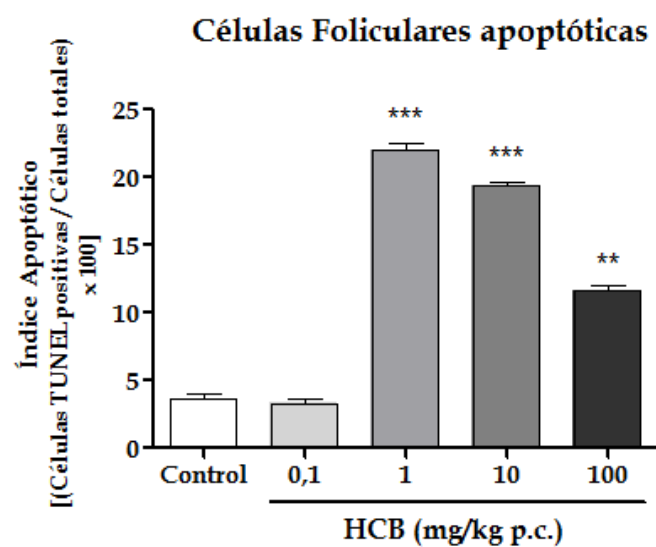


Figura 4: Apoptosis de células foliculares tiroideas. La apoptosis de las células foliculares fue determinada por la detección *in situ* del DNA fragmentado por la técnica de TUNEL (A) Fotografías representativas de cortes histológicos de

tiroides de ratas. Los núcleos positivos se visualizan con una coloración marrón-rojiza. a: Control; b: HCB 0,1 mg/kg p.c.; c: HCB 1 mg/kg p.c.; d: HCB 10 mg/kg p.c.; e: HCB 100 mg/kg p.c. **(B)** Cuantificación. Índice apoptótico: [(número de células marcadas por TUNEL/número de células totales) x 100]. Los valores representan las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

I.5. La apoptosis inducida por el HCB involucra la liberación del citocromo *c* de la mitocondria y la activación de la caspasa- 9

Existen dos vías principales responsables de transducir el estímulo apoptótico y llevar finalmente a la muerte celular. La vía mitocondrial o intrínseca y la vía de receptores de muerte o extrínseca. Cada una de ellas es integrada por numerosas proteínas activadas específicamente por distintos tipos de estímulos que convergen finalmente en la activación de caspasas ejecutoras de la muerte celular.

Para estudiar si el efecto apoptótico del HCB involucra un posible daño mitocondrial, se evaluó la liberación del citocromo *c* de la mitocondria hacia el citosol. Como se muestra en la Figura 5A, el HCB induce la liberación del citocromo *c* (88, 213, y 239%), de manera dosis dependiente (HCB 1, 10 y 100 mg/kg p.c., respectivamente). Consecuentemente, con la liberación del citocromo *c* hacia el citosol, se produce la activación por clivaje proteolítico de la caspasa-9 (192, 270, y 296%, HCB 1, 10 y 100 mg/kg p.c. respectivamente) (Figura 5 B). Estos resultados demuestran la participación de la vía mitocondrial en la apoptosis inducida por el HCB.

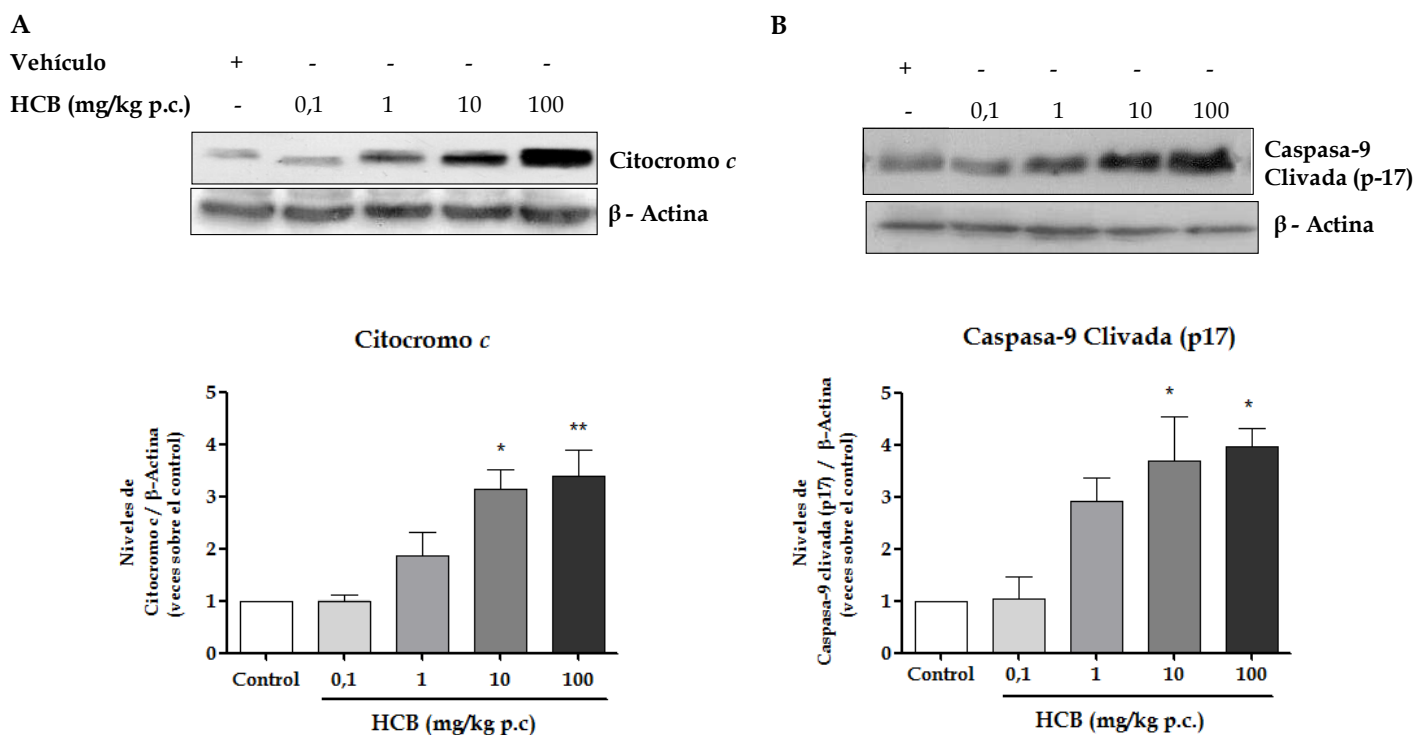


Figura 5: El HCB induce la liberación del citocromo *c* de la mitocondria y la activación de la caspasa-9. (A) Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas del citocromo *c* y β -Actina, en fracciones citosólicas de tiroides de ratas tratadas con HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) durante 30 días. (B) Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de la caspasa-9 activa y β -Actina, en fracciones citosólicas de tiroides de ratas tratadas con HCB 0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c. durante 30 días. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas al control. Los valores representan las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

I.6. El HCB no induce el clivaje proteolítico de la caspasa-8

Se ha reportado que la caspasa-8 activa, además de iniciar la cascada de activación de caspasas ejecutoras por proteólisis, puede inducir la liberación del citocromo *c* por el clivaje específico y posterior traslocación a la mitocondria de la proteína BID. El análisis de los niveles de pro-caspasa-8 (caspasa-8 FL) y caspasa-8 clivada (p-18), demostraron que durante la inducción de apoptosis por el HCB, no se produce de manera significativa, el procesamiento de la caspasa-8 (Figura 6).

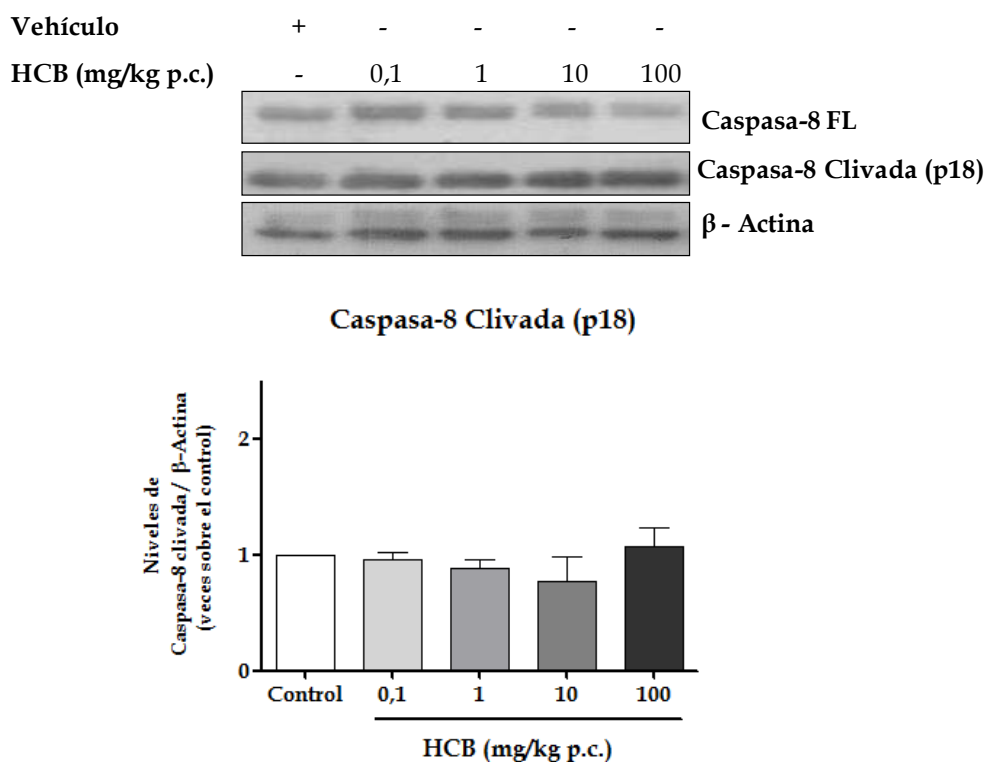


Figura 6: El HCB no altera el procesamiento de la caspasa-8. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de la caspasa-8 FL, caspasa-8 clivada y β -Actina, en fracciones citosólicas de tiroides de ratas tratadas con HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) durante 30 días. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas al control. Los valores representan las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

En conjunto, los resultados de las secciones I.5 y I.6, demuestran que la apoptosis inducida por el HCB, está mediada por caspasas e involucra la vía mitocondrial.

I.7. El HCB aumenta los niveles de expresión de la enzima antioxidante catalasa

El estrés oxidativo juega un rol importante en el mecanismo de acción del HCB sobre la neuro y hepatotoxicidad en ratas. Se ha demostrado que el tratamiento con HCB, produce aumentos en la peroxidación lipídica e incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes tales como SOD y catalasa en hipocampo de ratas (Li et al., 2006).

Con el objetivo de determinar el efecto de la exposición al HCB sobre el estatus oxidativo celular de la glándula tiroides, se determinaron los niveles de expresión de la enzima antioxidante catalasa.

Los resultados demostraron que todas las dosis de HCB ensayadas (0,1; 1; 10; 100 mg/kg p.c.) inducían la expresión de la enzima catalasa (175, 336, 300, y 353 %, respectivamente) (Figura 7), sugiriendo que los niveles de ROS podrían estar incrementados como consecuencia de la exposición al HCB.

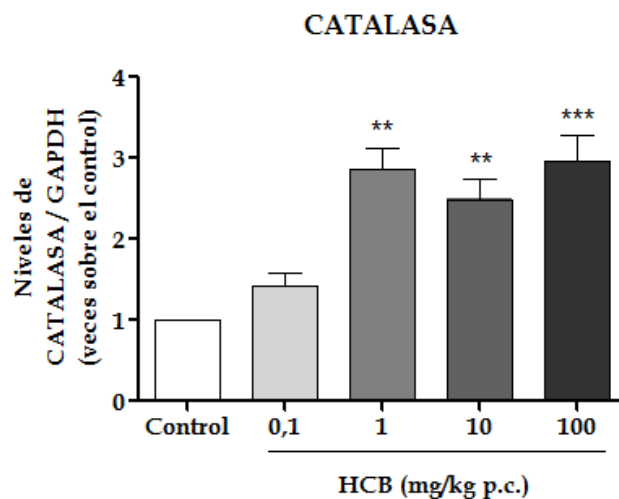
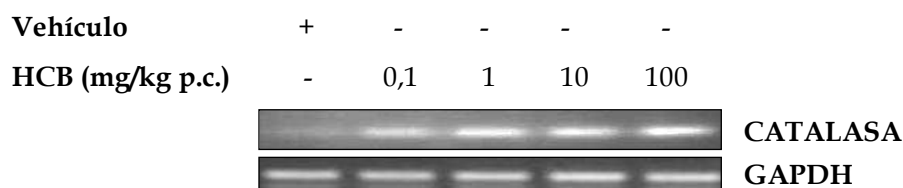


Figura 7: Niveles de expresión del gen de la enzima antioxidante catalasa. Las ratas fueron tratadas con HCB (0,1; 1; 10 y 100 mg/kg p.c.) durante 30 días. Los niveles mRNA de la enzima catalasa fueron evaluados por la técnica de RT-PCR, a partir del cDNA sintetizado del RNA total de tiroides de las ratas de cada grupo. GAPDH fue utilizado como control de carga. Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas de las fotografías obtenidas de los geles con bromuro de etidio. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a GAPDH y normalizadas al control. Los valores representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes de cuatro ratas por grupo. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores control. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

CAPITULO II

Modelo *in vitro*: Células FRTL-5

II.1. El HCB induce la expresión de TGF- β 1 en células FRTL-5

Como hemos visto en el capítulo I, la expresión de TGF- β 1 es incrementada como consecuencia del tratamiento con HCB a ratas, de manera dosis dependiente. El TGF- β 1 es un potente inhibidor del crecimiento, e inductor de apoptosis de células foliculares tiroideas, a través de numerosos mecanismos que involucran el desbalance de la expresión de proteínas específicas reguladoras del ciclo celular y de la apoptosis (Coppa et al., 1995; Carneiro et al., 1998) y la generación de ROS (Yoon et al., 2005), entre otros mecanismos.

Para evaluar si efectos similares ocurrían en las células FRTL-5, se estudió el efecto del HCB en la inducción de la expresión de TGF- β 1, en función de la dosis (0,005; 0,05; 0,5; 5 μ M) y el tiempo de tratamiento (2, 6, 8, y 24 horas).

Los resultados demostraron que la expresión de TGF- β 1 aumenta (100 y 70%) con HCB 5 μ M a las 6 y 8 horas, registrándose una máxima inducción a las 6 horas (Figura 1A). Dicho tiempo fue utilizado para realizar los ensayos en función de la dosis. El HCB aumenta la expresión de TGF- β 1 de manera dosis dependiente (300 y 150% HCB 0,5 y 5 μ M, respectivamente) (Figura 1B).

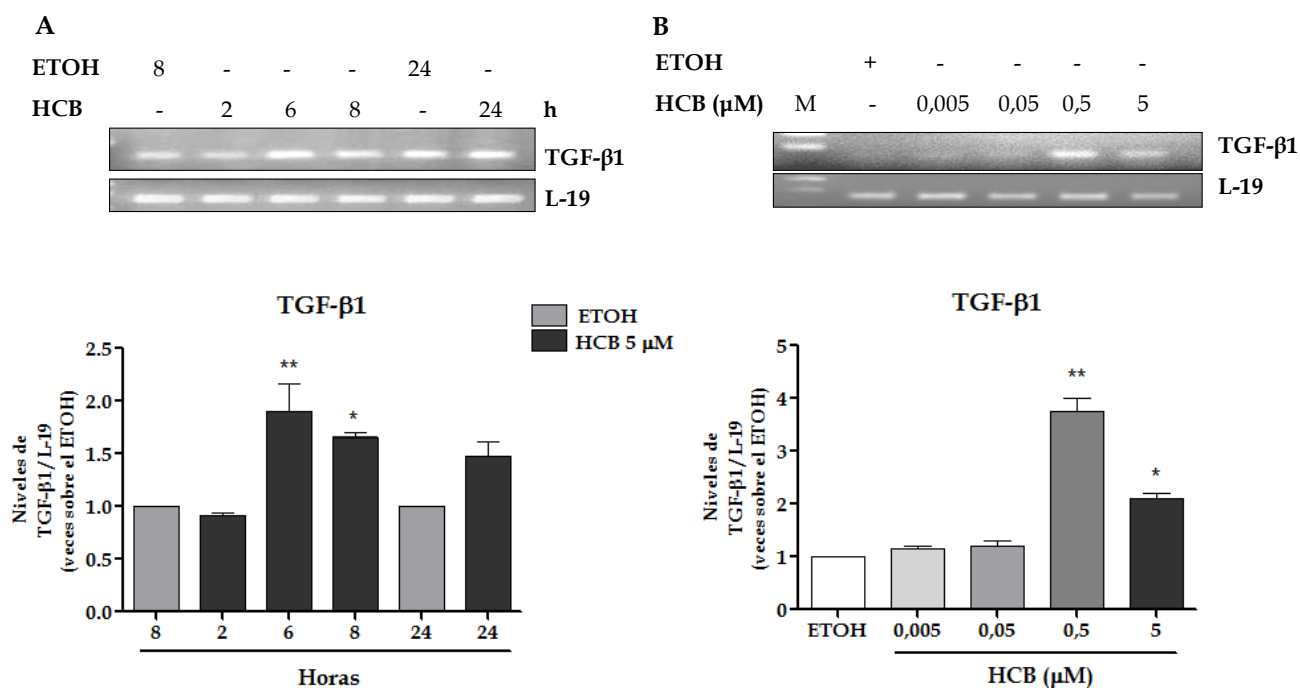
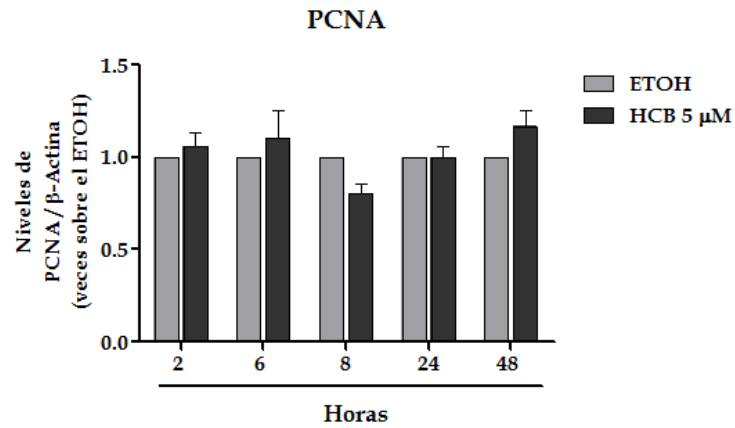
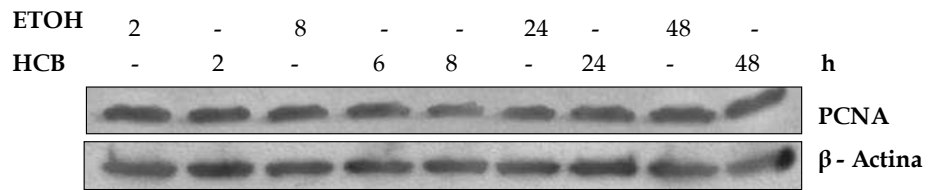


Figura 1: Niveles de expresión de TGF-β1. Los niveles de expresión de TGF-β1 fueron evaluados por la técnica de RT-PCR, a partir del cDNA sintetizado del RNA total de células FRTL-5 (A) tratadas con HCB 5 μM durante 2, 6, 8 y 24 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM durante 6 horas. L-19 fue utilizado como control de carga. Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas de las fotografías obtenidas de los geles teñidos con bromuro de etidio. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a L-19 y normalizadas a su control. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * p<0,05 y ** p<0,01 significativamente diferentes respecto de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.2. El HCB no incrementa la proliferación de células FRTL-5

Para evaluar el efecto del HCB sobre la proliferación de células FRTL-5, se determinaron los niveles de la proteína PCNA, a distintas dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) y tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas) de tratamiento con HCB. Los resultados demostraron que el HCB, no incrementa significativamente la proliferación celular, en ninguno de los tiempos y dosis ensayadas (Figura 2A y B).

A



B

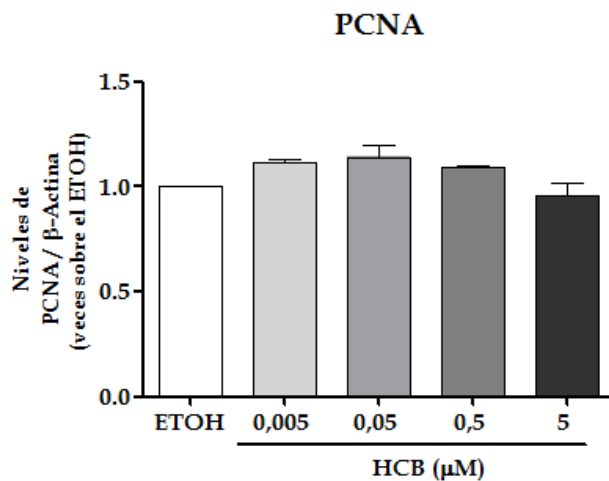
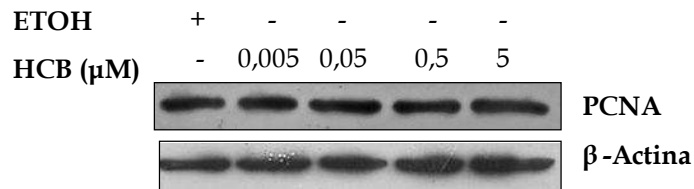


Figura 2: El HCB no incrementa la proliferación de células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de PCNA y β -Actina en lisado total de células FRTL-5 **(A)** tratadas ETOH o HCB 5 μ M durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, **(B)** tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μ M, durante 24 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizada a la β -Actina y normalizadas a su control. Los

valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.3. Efecto del HCB sobre la viabilidad de celular

El efecto del HCB sobre la viabilidad de células FRTL-5, fue evaluado por el ensayo de MTT. Dicho ensayo, se basa principalmente en la capacidad metabólica mitocondrial, reflejando de esta manera la viabilidad celular. Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de HCB (0,005; 0,05; 0,5; 5 μ M) a distintos tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas). Los resultados demostraron que el HCB 0,5 y 5 μ M, induce una disminución en la viabilidad celular de entre el 15 y el 28% a partir de las 8 horas de tratamiento (Figura 3). Estos resultados reflejan un efecto citotóxico del HCB sobre esta línea celular.

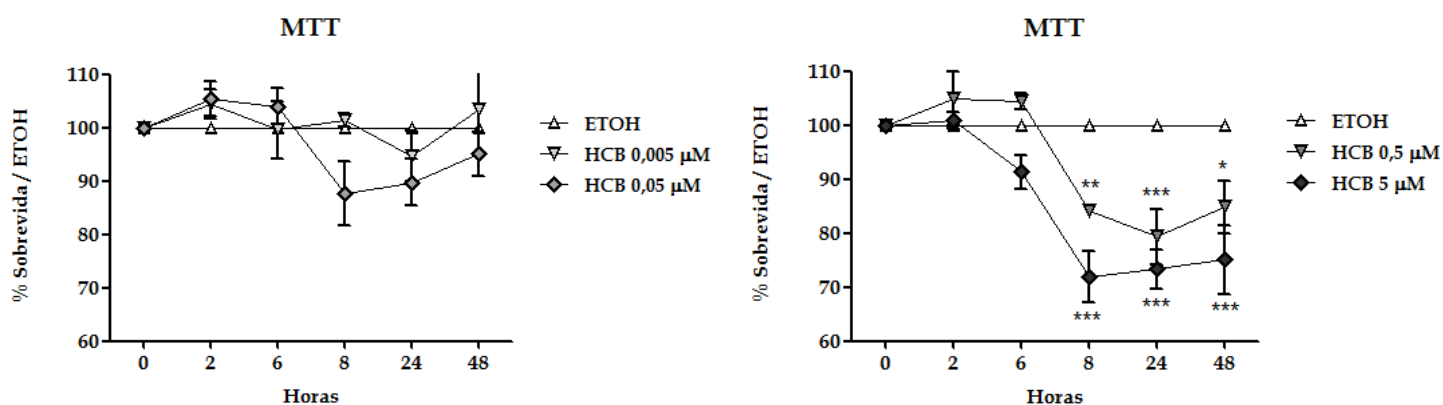


Figura 3: Efecto de HCB sobre la viabilidad de células FRTL-5. Análisis del porcentaje de sobrevivencia respecto del ETOH. Ensayos en función de la dosis (HCB 0,005; 0,05; 0,5; 5 μ M) y tiempo de exposición (2, 6, 8, 24 y 48 horas). Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.4. El TGF- β 1 no está involucrado en la pérdida de viabilidad celular inducida por el HCB, a través de la señalización por proteínas SMAD

Como ya hemos mencionado, el TGF- β 1 es una citoquina multifuncional que regula un gran número de procesos biológicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, dependiendo del contexto y tipo celular.

Hemos demostrado en este trabajo que el tratamiento con HCB induce la expresión de dicha citoquina tanto *in vivo*, en ratas Wistar hembras (Figura 2 Capítulo I) como *in vitro*, en células FRTL-5 (Figura 1 Capítulo II). Para dilucidar la posible relación entre el aumento de la expresión del TGF- β 1 y la pérdida de viabilidad inducida por el HCB, se efectuaron estudios de viabilidad celular, por la técnica de MTT, en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de TGF- β 1, SB431542 (0,25; 0,5; 0,75 y 1 μ M). El SB431542 es una pequeña molécula que inhibe de manera potente y selectiva al receptor tipo I de TGF- β 1. Este compuesto no tiene efecto sobre las vías de señalización de ERK, JNK y/o p38 MAPKs.

En la Figura 4A, se muestra que la exposición de las células FRTL-5 al HCB 5 μ M en presencia del inhibidor SB431542, no altera la citotoxicidad inducida por el HCB (5 μ M) en ausencia del mismo. Se evaluó además, el efecto del inhibidor SB431542, "per se", sobre la viabilidad celular, incubando las células con dosis crecientes del mismo. Las dosis utilizadas del inhibidor SB431542, no inducen efectos sobre la viabilidad celular (Figura 4B). Estos resultados demuestran, que el TGF- β 1, a través de la vía de señalización de las proteínas SMAD, no es el mediador en la pérdida de viabilidad celular inducida por el HCB.

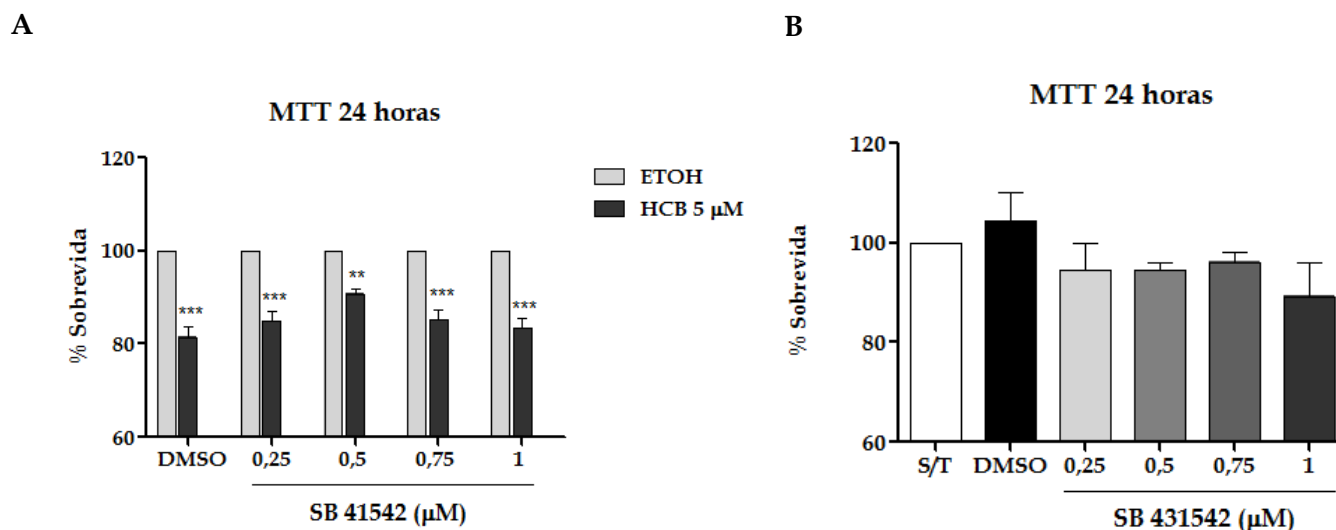


Figura 4: El TGF- β 1 no está involucrado en la pérdida de viabilidad celular inducida por el HCB, a través de la señalización por proteínas SMAD. (A) Análisis de la viabilidad celular por el ensayo de MTT de células pre-tratadas con DMSO o SB431542 (0,25; 0,5; 0,75 y 1 μ M) durante 2 horas y tratadas durante 24 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. (B) Análisis de la viabilidad celular por MTT de células sin tratamiento (S/T) tratadas con

DMSO o SB431542 (0,25; 0,5; 0,75 y 1 μ M) durante 24 horas. Los valores representan las medias del % de supervivencia respecto del control \pm SEM de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores y ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Bonferroni y Tukey respectivamente, para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.5. La pérdida de viabilidad inducida por el HCB no es dependiente del AhR

Se ha demostrado que el HCB es un agonista débil del AhR, presentando una afinidad 10.000 veces menor respecto de un agonista fuerte como el TCDD (Hahn et al., 1989). Con el objetivo de determinar si la pérdida de viabilidad inducida por el HCB en células FRTL-5, está mediada por su interacción con dicho receptor, se realizaron ensayos de viabilidad celular en presencia del antagonista específico, no relacionado estructuralmente, 4,7-orthophenanthroline (4,7 PHE). Previamente determinamos por la técnica de Western blot, que los niveles proteicos de AhR son detectables, en la línea celular FRTL-5 (Figura 5A).

Los ensayos de viabilidad en presencia de distintas dosis de 4,7 PHE (5, 10, 20 y 30 μ M) demostraron que el HCB (5 μ M) es capaz de inducir citotoxicidad aún en presencia del antagonista (Figura 5B), mostrando tener un mecanismo independiente de su unión a dicho receptor. El 4,7 PHE por sí mismo no induce ningún efecto citotóxico en las células FRTL-5 (Figura 5 C).

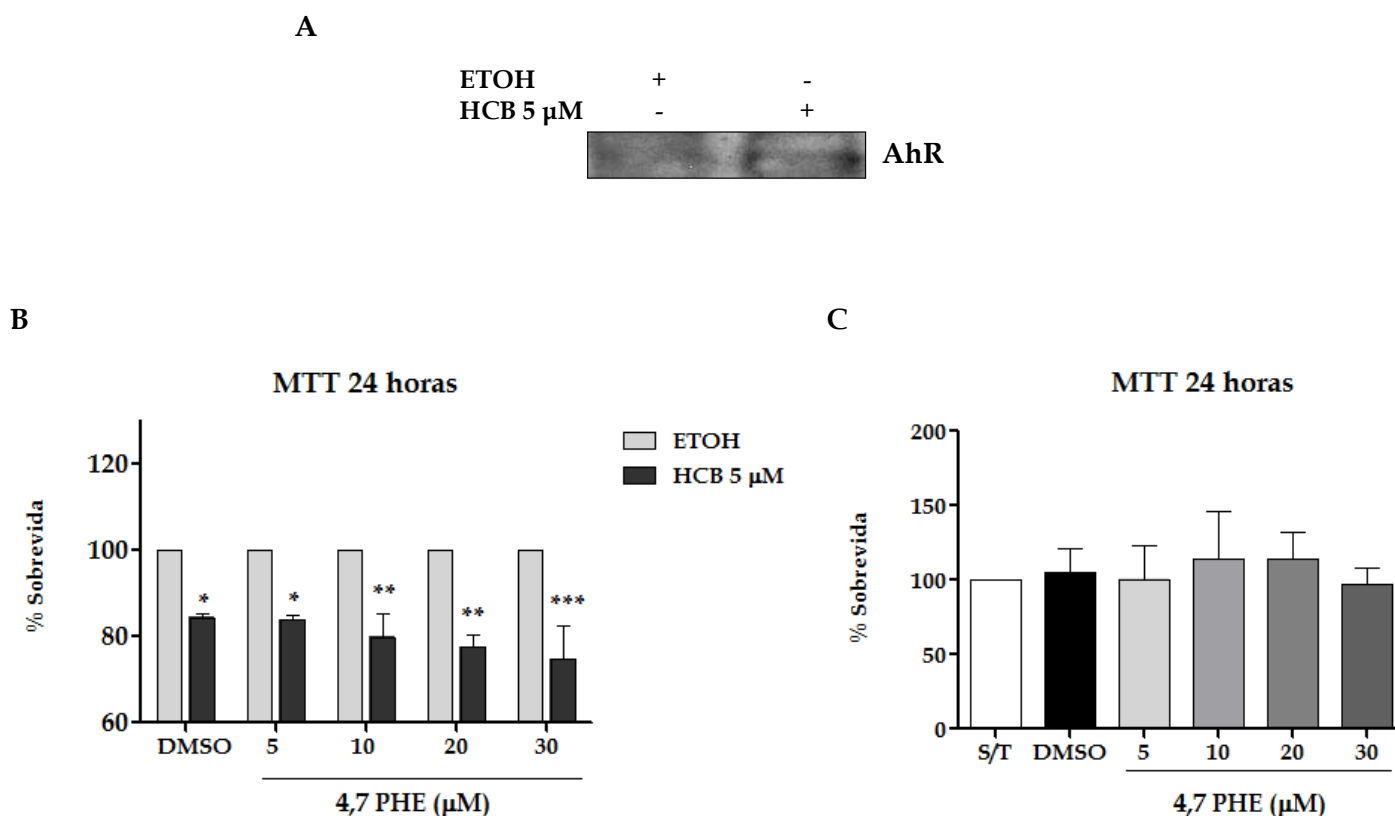


Figura 5: La pérdida de viabilidad inducida por el HCB no es dependiente del AhR. (A) Inmunodetección por Western blot del AhR en lisado total de células FRTL-5 tratadas con ETOH y HCB 5 μ M durante 8 horas. (B) Análisis de la viabilidad celular por MTT de células pre-tratadas con DMSO o 4,7 PHE (5, 10, 20 y 30 μ M) durante 2 horas y tratadas durante 24 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. (C) Análisis de la viabilidad celular por MTT de células sin tratamiento (S/T), tratadas con DMSO o 4,7 PHE (5, 10, 20 y 30 μ M) durante 24 horas. Los valores representan las medias del % de sobrevida respecto del control \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores y ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Bonferroni y Tukey respectivamente, para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.6. La exposición al HCB induce la apoptosis de células FRTL-5

Los efectos tóxicos producidos en distintos tejidos y tipos celulares, por numerosos compuestos organoclorados, involucran entre otros mecanismos, la inducción de apoptosis (Dreiem et al., 2009; Shi et al., 2011). Para confirmar si la citotoxicidad inducida por el HCB en células FRTL-5 era debida a un incremento en la apoptosis, se evaluó a distintos tiempos y dosis, la morfología nuclear, la fragmentación del ADN y la activación de la caspasa efectora-3. La activación de la caspasa-3, se da por clivaje proteolítico, inducido por las caspasas iniciadoras de las distintas vías apoptóticas, y representa un marcador temprano de la apoptosis. En cambio, la fragmentación del ADN, representa un marcador tardío e irreversible de la misma.

Luego del tratamiento a distintos tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas) y dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) de HCB, las células fueron fijadas para su tinción con Hoechst y análisis de la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL, o lisadas para el análisis de los niveles de caspasa-3 clivada (p-17) por Western blot.

El HCB (0,5 y 5 μM) induce un aumento significativo en el número de núcleos con morfología apoptótica, tanto a las 8 horas (5,1 y 10%, respectivamente) como a las 24 horas de tratamiento (3,4 y 5,1%, respectivamente) (Figura 6). La morfología apoptótica comprende, núcleos con cromatina condensada, marginada, y fragmentos de cromatina seriamente clivada, dando como resultado cuerpos apoptóticos. Sumado a esto, la técnica de TUNEL, reveló la presencia de núcleos positivos a las 6, 8 y 24 horas de tratamiento con HCB 5 μM (Figura 7). Las células tratadas con ETOH, en cambio, no mostraban cambios en la forma y tamaño de sus núcleos, presentando una fluorescencia de Hoechst uniforme y ausencia de marcación por la técnica de TUNEL (Figura 6 y 7).

Respecto de la activación de la caspasa-3, estudios en función de la dosis realizados durante 8 horas de tratamiento, demostraron que el HCB, induce el clivaje proteolítico de la caspasa-3, de manera dosis dependiente (HCB 0,5 μM : 350 % y HCB 5 μM : 500 %) (Figura 8A). Para tratar de identificar si la menor dosis de HCB (0,005 μM), induce efectos sobre la activación de la caspasa-3, a tiempos más prolongados, se realizaron estudios en función del tiempo de exposición. Los resultados demostraron que la dosis de 0,005 μM era incapaz de inducir el clivaje de la caspasa-3 a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 8B). Por el contrario, los estudios en función del tiempo de tratamiento, con la dosis de HCB 5 μM , demostraron que el HCB afecta el procesamiento de dicha caspasa a partir de las 6 horas (150%), presentando un máximo a 8 horas de tratamiento (500 %), retornando a los valores controles a las 24 y 48 horas (Figura 8C).

En conjunto estos resultados, muestran que el HCB induce apoptosis en células FRTL-5 de manera tiempo y dosis dependientes, llevando a la activación de caspasas efectoras, y a la condensación y fragmentación del ADN.

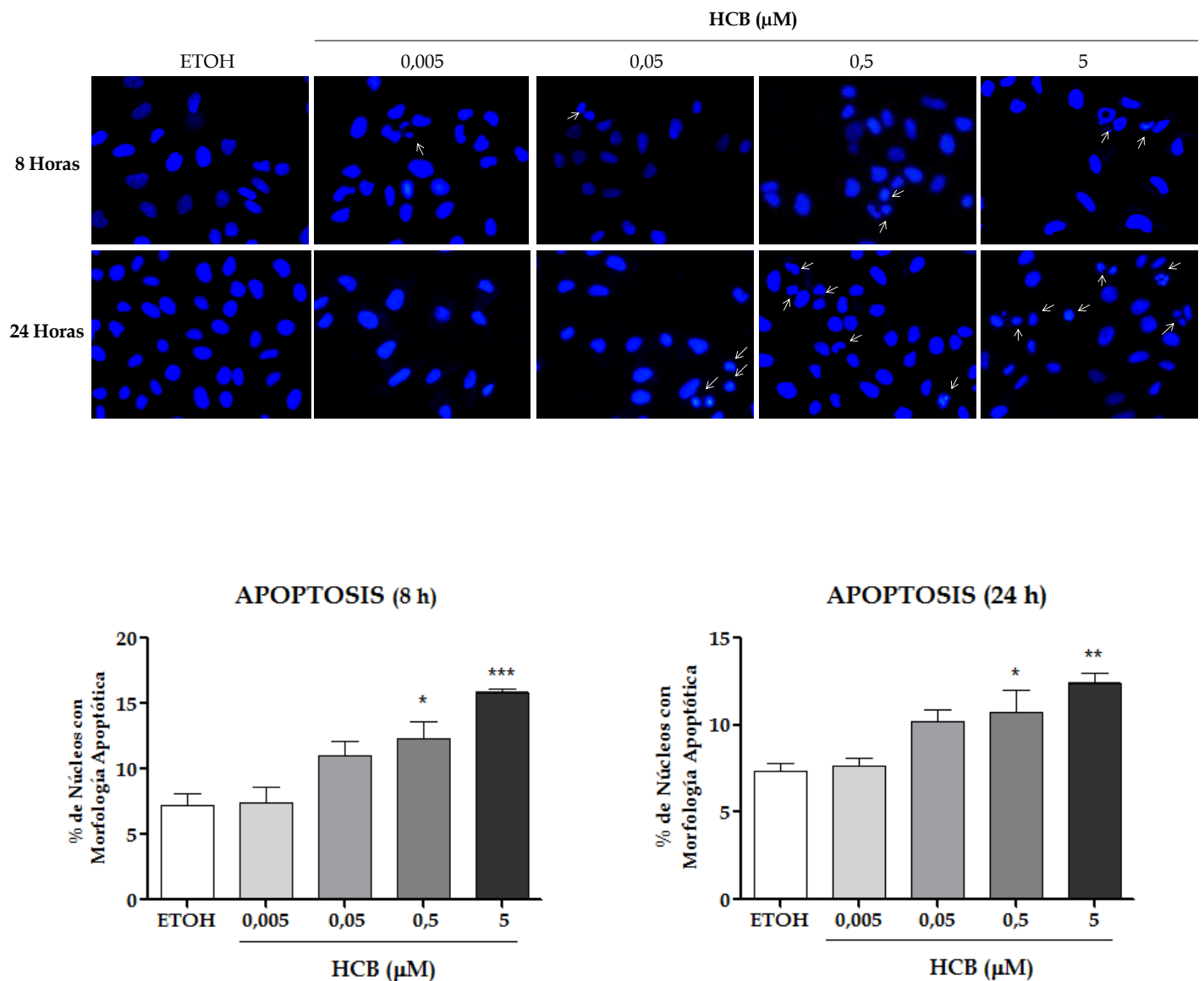


Figura 6: El HCB produce un incremento en el número de células con morfología apoptótica. Tinción con Hoechst de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 8 y 24 horas. Aumento 400X. Los valores expresados en porcentaje, representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

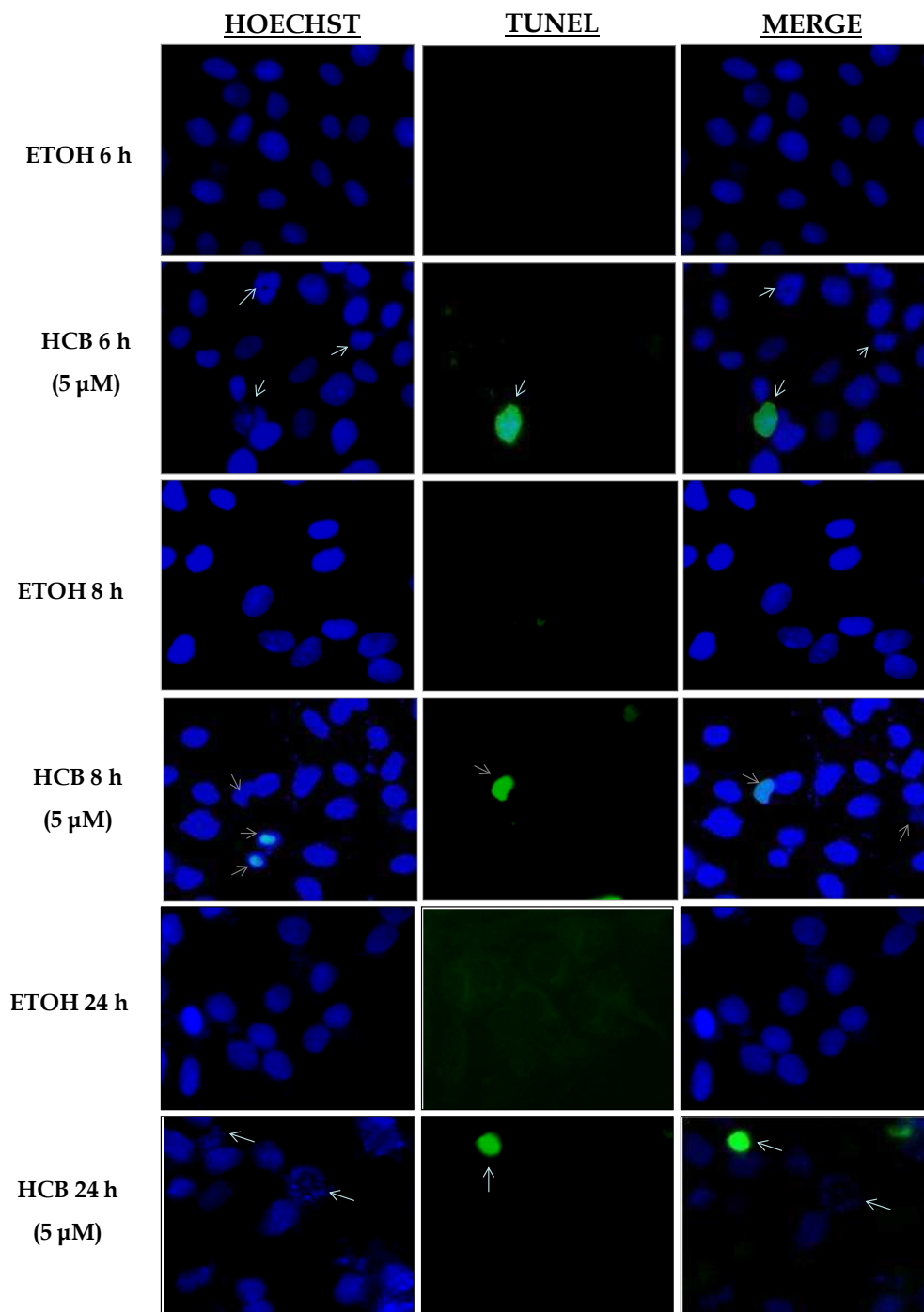
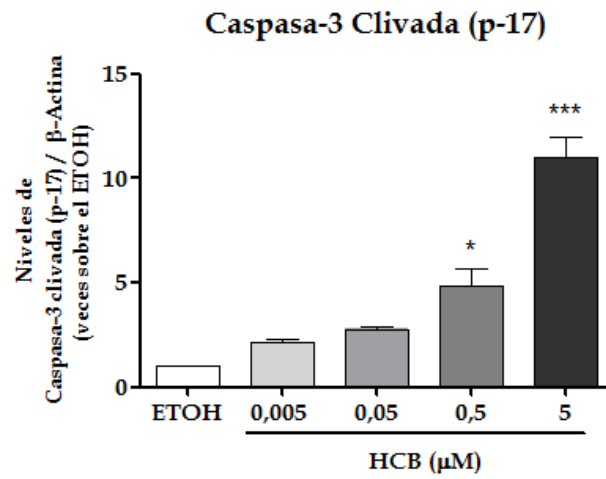
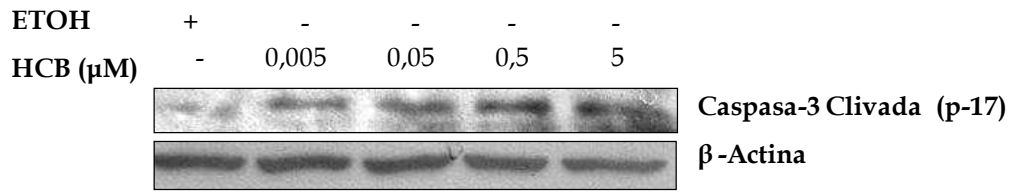
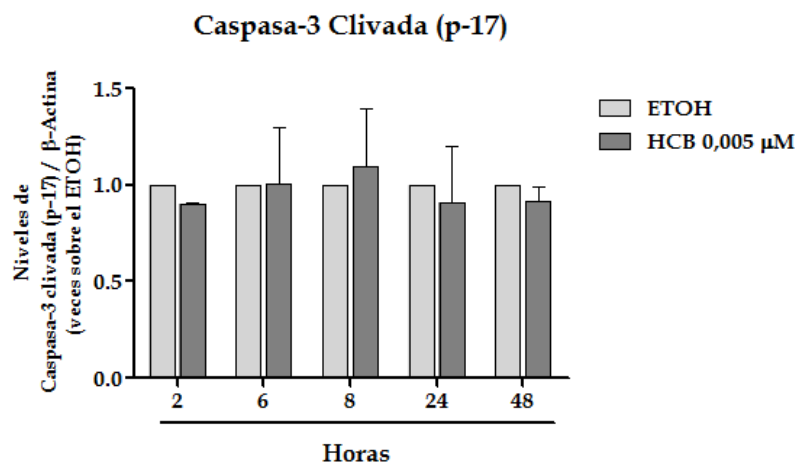
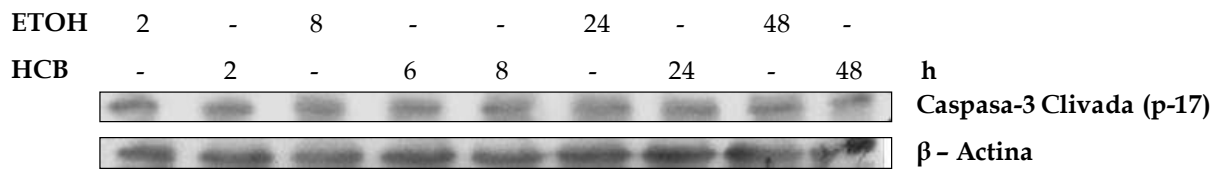


Figura 7: El HCB induce la fragmentación del DNA. Análisis de la fragmentación del DNA por la técnica de TUNEL de células tratadas con HCB 5 μ M durante 6, 8 y 24 horas. Aumento 600X.

A



B



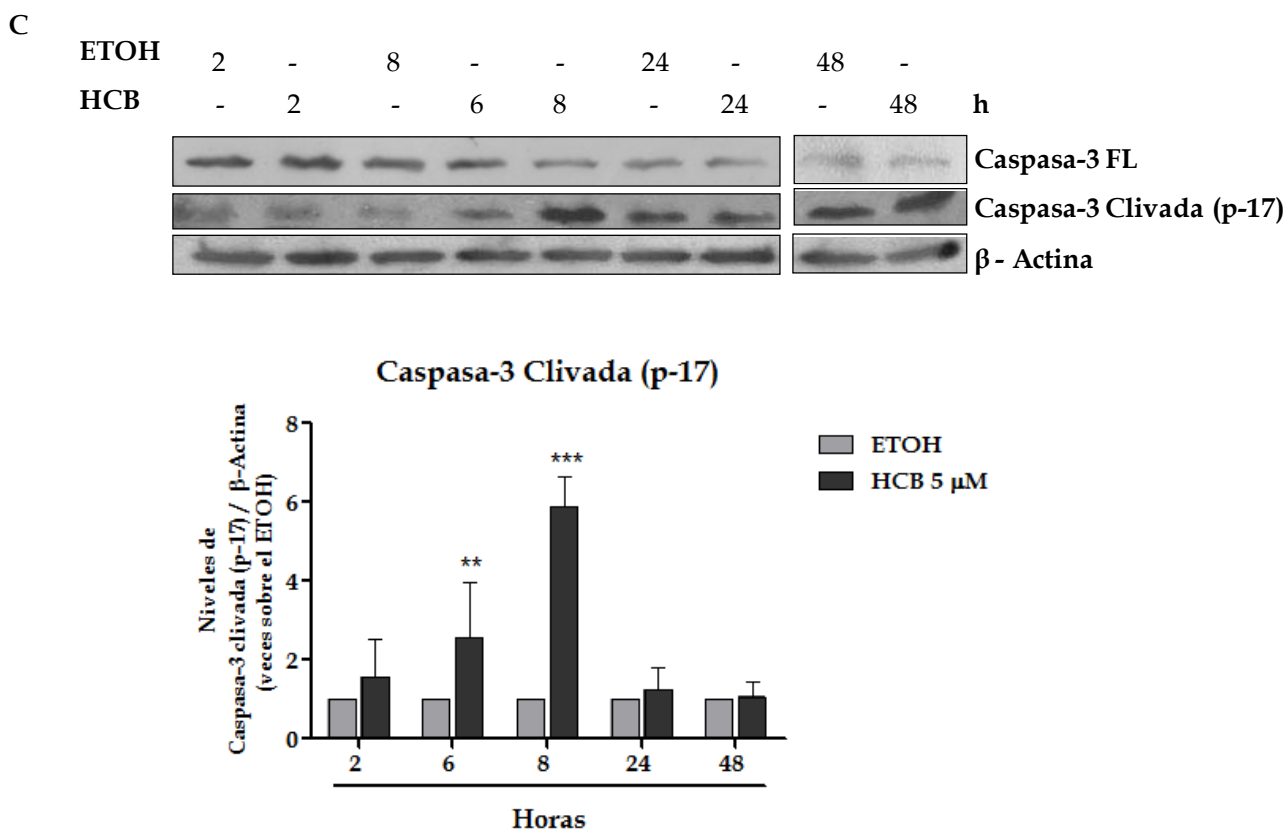


Figura 8: El tratamiento con HCB induce la activación de la caspasa-3 en células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de la caspasa-3 clivada y β -Actina en lisado total de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μ M, durante 8 horas, (B y C) tratadas con ETOH o HCB 0,005 y 5 μ M durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.7. Efecto del HCB sobre parámetros funcionales de células FRTL-5

En células foliculares tiroideas el TGF- β 1, no sólo es un potente inhibidor del crecimiento celular e inductor de apoptosis, sino que también, suprime ciertos marcadores de diferenciación celular, como el Na⁺/I⁻ simporter (NIS) (Kawaguchi et al., 1997), la tiroglobulina (TG) (Colleta et al., 1989) y el receptor de TSH (TSHR) (Franzen et al., 1999). La TG representa una molécula específica de la tiroides, necesaria para la formación y el almacenamiento de las hormonas tiroideas. Teniendo en cuenta que el HCB aumenta la expresión de TGF- β 1 e induce un aumento significativo de la apoptosis en células FRTL-5, investigamos el efecto de dicho compuesto organoclorado sobre los niveles proteicos de TG, como marcador de diferenciación y funcionamiento celular.

La exposición de las células FRTL-5, durante 24 horas, al HCB 5 μM , induce una disminución significativa en los niveles de la proteína TG (50 %), sugiriendo que el pesticida induce la pérdida de funciones específicas de las células FRTL-5 (Figura 9).

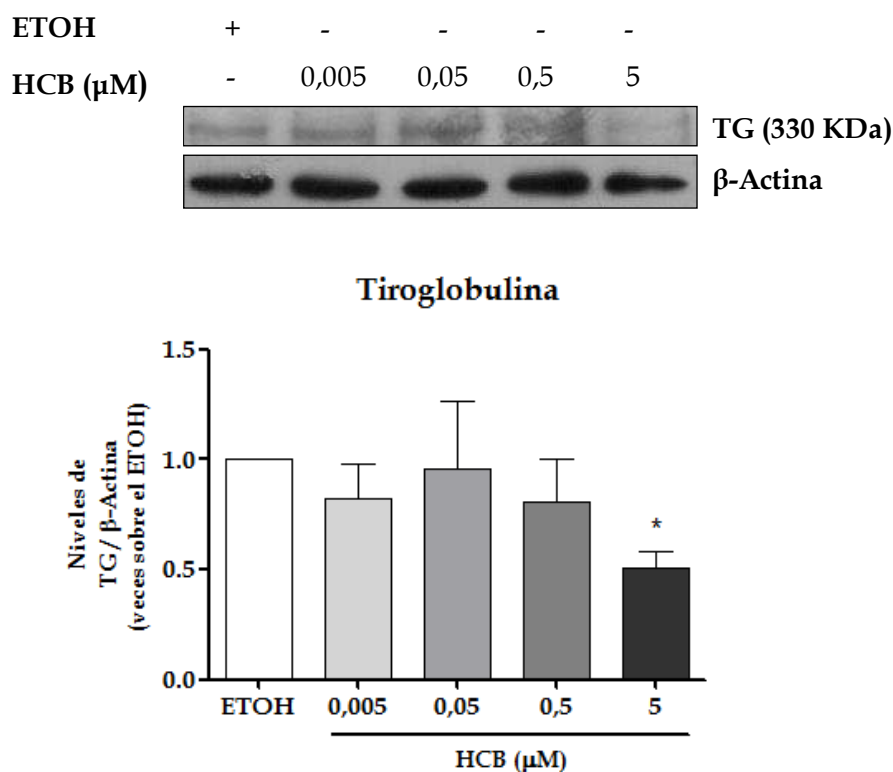


Figura 9: Efecto del HCB sobre la funcionalidad de células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de TG y β -Actina en lisado total de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 24 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.8. El HCB induce la activación de caspasas iniciadoras de la vía de receptores de muerte

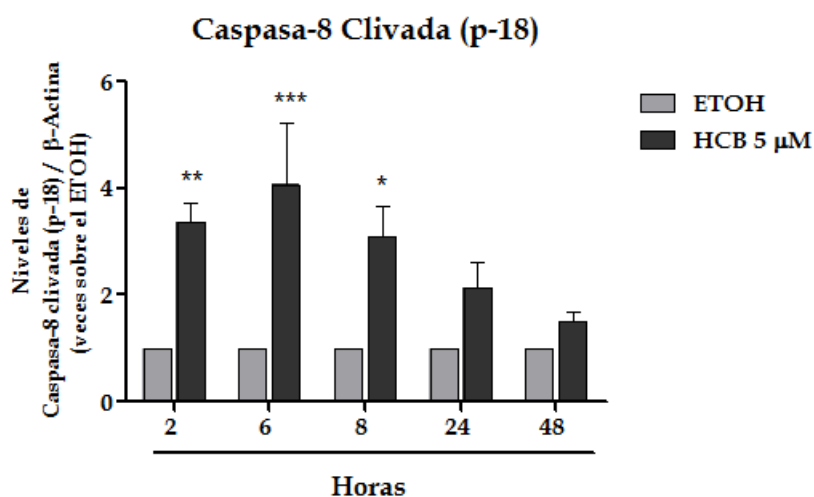
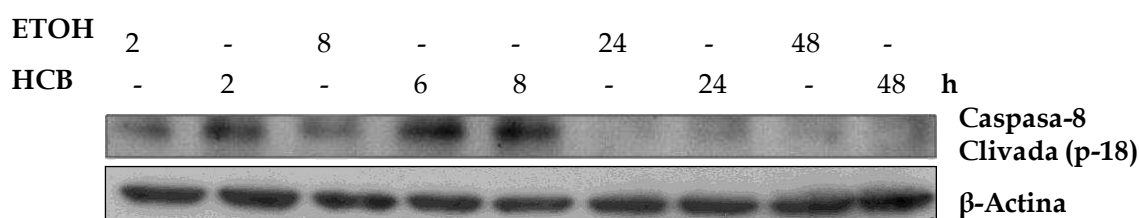
La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada disparado por numerosos estímulos que llevan a la activación de dos vías principales, la vía mitocondrial o vía intrínseca y la vía de receptores de muerte o vía extrínseca.

Para determinar si caspasas iniciadoras de la vía extrínseca o de receptores de muerte estaban involucradas en la apoptosis mediada por el HCB, analizamos los niveles proteicos de la caspasa-8 y la

caspasa-10. Luego del tratamiento a distintos tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas) y dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μ M) de HCB, las células fueron lisadas para su análisis por Western blot y se detectaron los niveles de caspasa-8 clivada (p18) y procaspasa-10 (Caspasa-10 FL).

Los resultados demostraron que el HCB induce la activación, de las caspasas-8 y -10, de manera dependiente de la dosis y el tiempo de tratamiento. La caspasa-8 es clivada tempranamente, a partir de las 2 horas (250 %) hasta las 8 horas (200%) de tratamiento con HCB 5 μ M, presentando un máximo de activación a las 6 horas (300 %) (Figura 10A). Se observó una tendencia al aumento de la caspasa-8 clivada a las 24 horas de tratamiento. El clivaje de la caspasa-10, se induce entre las 6 horas (80 %) y las 8 horas (85 %), con HCB 5 μ M (Figura 11A). Ambas caspasas (-8 y -10) son activadas de manera dosis dependiente, con HCB 0,05, 0,5 y 5 μ M a las 8 horas de tratamiento (Figura 10B y 11B).

A



B

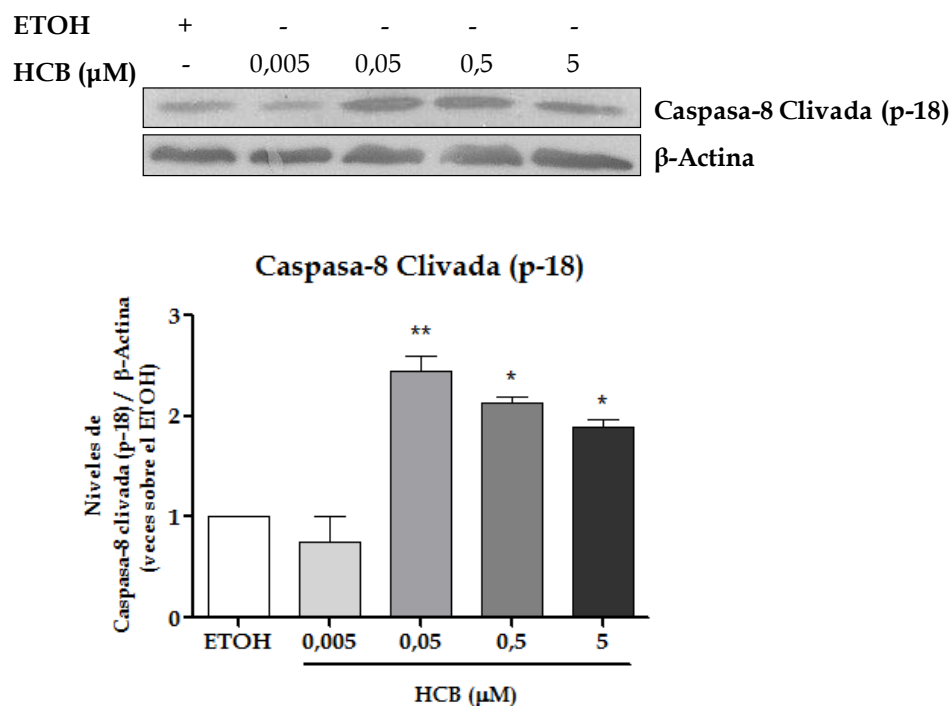
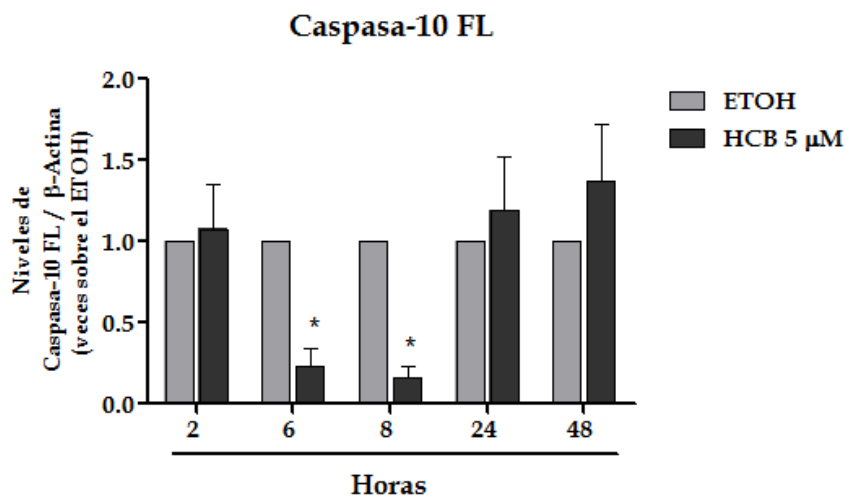
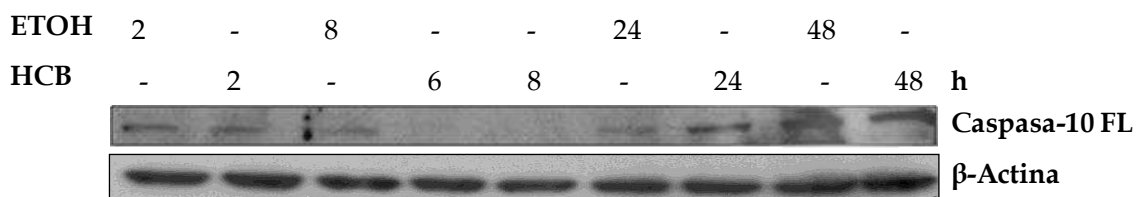


Figura 10: La apoptosis inducida por el HCB involucra la activación de la caspasa-8. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de caspasa-8 clivada (p18) y β -Actina en lisado total de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 8 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

A



B

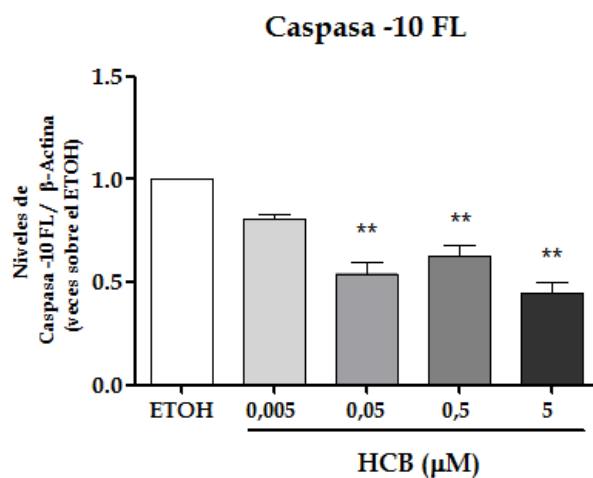
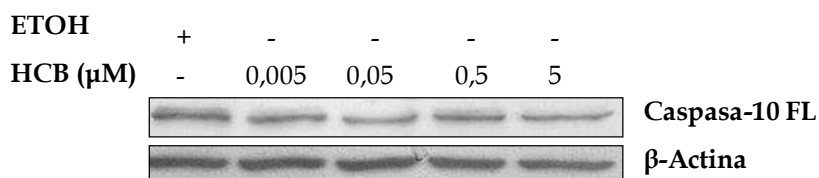


Figura 11: La apoptosis inducida por el HCB involucra la activación de las caspasa-10. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de caspasa-10 FL y β-Actina en lisado total de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM,

durante 8 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.9. El HCB induce la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria hacia el citosol

Se ha demostrado que el daño mitocondrial producido por ciertas drogas inductoras de apoptosis, se acompaña de la liberación de factores apoptóticos hacia el citosol, luego de una disrupción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Kroemer y Reed, 2000). El AIF, confinado en el espacio intermembrana mitocondrial, es liberado al citosol, para luego translocarse al núcleo, donde induce la apoptosis independiente de caspasas, gracias a su actividad de endonucleasa, provocando la condensación y fragmentación del ADN en fragmentos de alto peso molecular. Los estudios en función del tiempo de tratamiento mostraron que el HCB 5 μM , induce la liberación del AIF hacia el citosol a todos los tiempos ensayados (2, 6, 8, 24 y 48 horas) (120, 145, 200, 150 y 155%, respectivamente), así como su translocación al núcleo (Figuras 12A y C). Los ensayos en función de la dosis se realizaron durante 8 horas de tratamiento y demostraron que sólo el HCB 5 μM es capaz de inducir la liberación del AIF hacia el citosol (Figura 12B).

El citocromo *c*, otra proteína apoptótica, orquesta la formación del apoptosoma y activación de la caspasas-9 y -3. Nuestros resultados demuestran que el citocromo *c*, también es rápidamente liberado hacia el citosol, a las 2 horas de tratamiento con HCB 5 μM . Sin embargo, su presencia citoplasmática desaparece en los tiempos subsiguientes (Figura 13).

En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición al HCB, induce tanto vías dependientes como independientes de caspasas que podrían involucrar la activación de receptores de muerte y la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria, como el AIF y el citocromo *c*.

C

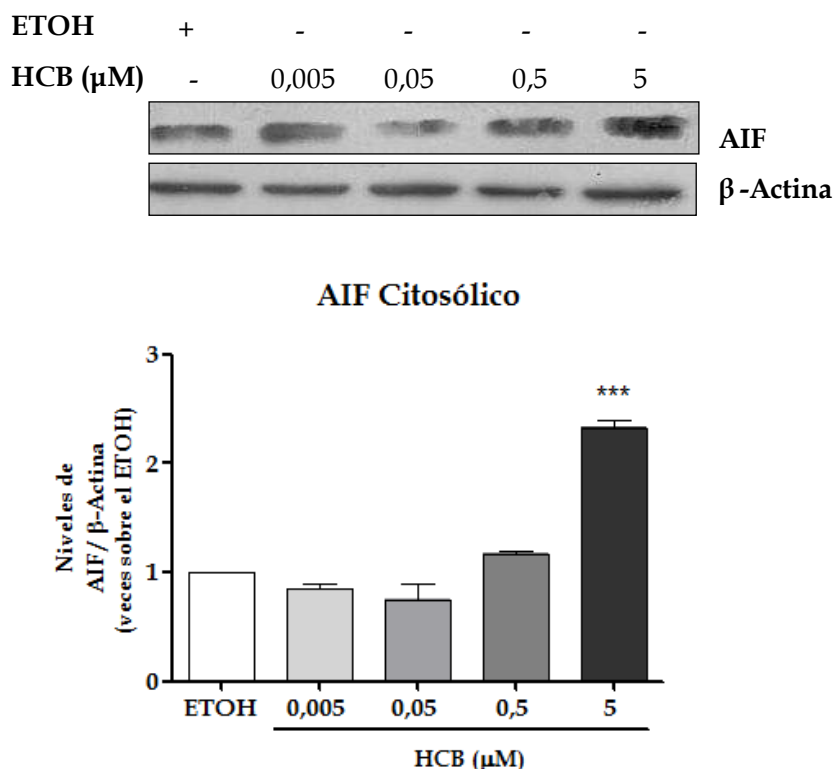


Figura 12: La apoptosis inducida por el HCB involucra la activación de mecanismos independientes de caspasas. (A) Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de AIF y β -Actina en fracción citosólica de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas. El complejo III mitocondrial es una proteína específica de mitocondria, se utilizó como control interno del fraccionamiento subcelular. **(B)** Inmunodetección por Western blot de AIF en fracción nuclear de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas. **(C)** Inmunodetección por Western blot y cuantificación de las bandas reactivas de AIF y β -Actina en fracción citosólica de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 8 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

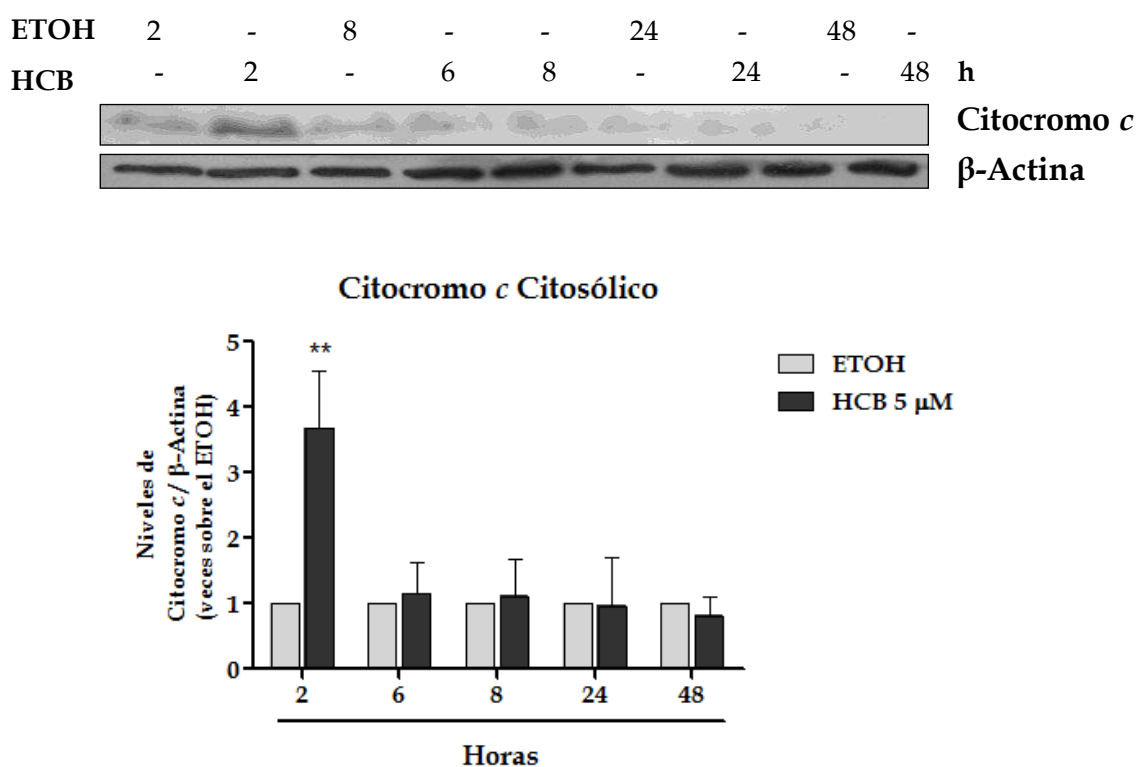


Figura 13: La apoptosis inducida por el HCB involucra la liberación del citocromo c hacia el citosol. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de citocromo c y β -Actina en fracción citosólica de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μ M durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.10. El HCB induce alteraciones en la morfología y pérdida del potencial de membrana mitocondrial

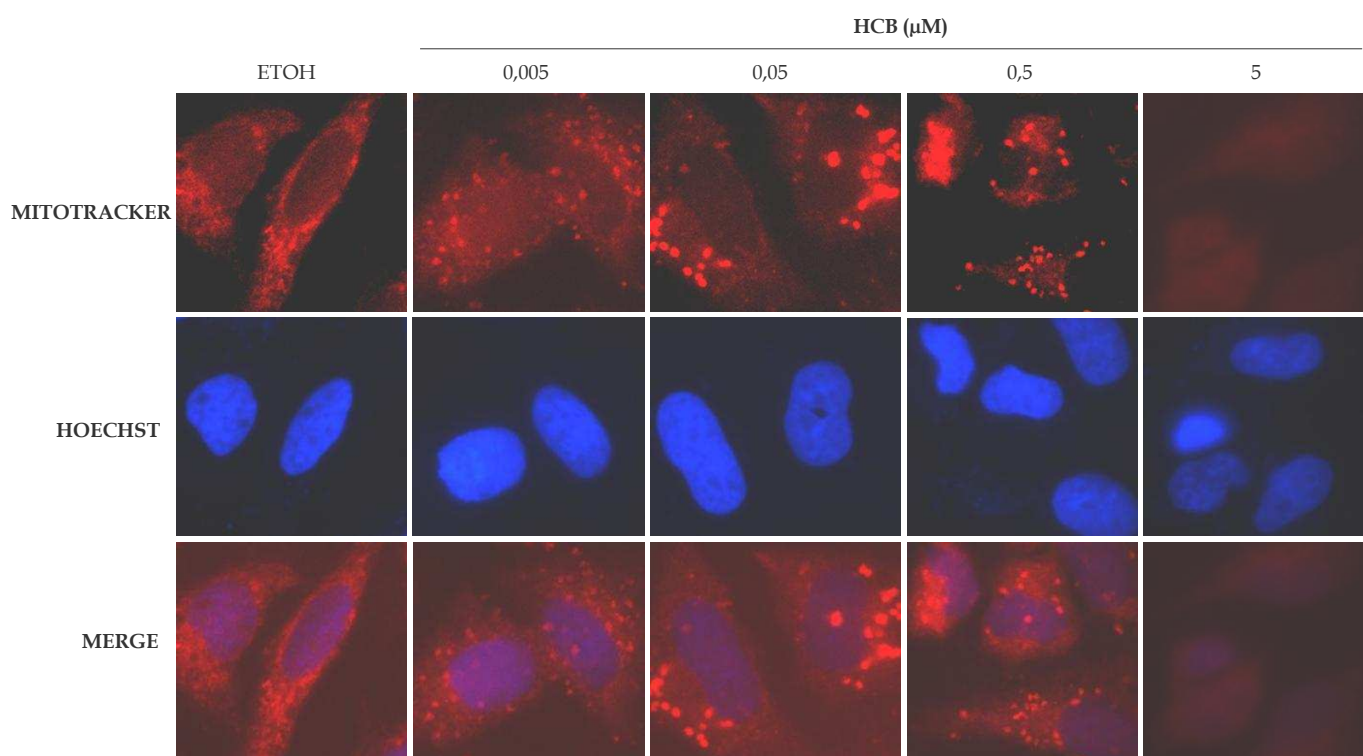
La mitocondria cumple un rol esencial en la inducción y propagación de la apoptosis. Está bien documentado que en estadios tempranos del proceso apoptótico, se altera tanto la morfología como el potencial transmembrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$).

Con el objetivo de estudiar la dinámica mitocondrial, luego de los tratamientos durante 6 horas con distintas dosis de HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μ M), las células FRTL-5 fueron incubadas con MitoTracker Red 580, y posteriormente fijadas para su análisis en el microscopio óptico de fluorescencia.

La red tubular mitocondrial, evidenciada en las células FRTL-5 tratadas con ETOH, resulta fragmentada como consecuencia de la exposición al HCB. La Figura 14 muestra que la exposición al HCB (0,05 y 0,5 μ M) durante 6 horas induce un aumento en el porcentaje de células que presentan sus mitocondrias fragmentadas respecto del tratamiento con ETOH (ETOH: 18%, HCB 0,05 μ M: 60,5 % y HCB

0,5 μM : 73,3 %). Las mitocondrias fragmentadas se visualizan con una apariencia punteada o granular en el citosol celular.

Las células tratadas con HCB 5 μM exhiben una importante reducción en el mantenimiento del fluorocromo dentro de la mitocondria y una pérdida significativa de la intensidad de la fluorescencia, la cual se observa de manera difusa dentro de la misma. El mantenimiento de la fluorescencia de MitoTracker Red 580 dentro de la mitocondria, es dependiente del $\Delta\psi\text{m}$ (Pendergrass et al., 2004), de manera que este resultado refleja un colapso del $\Delta\psi\text{m}$, caracterizado por la apertura de los megacanales o poros de permeabilidad transitoria mitocondriales.



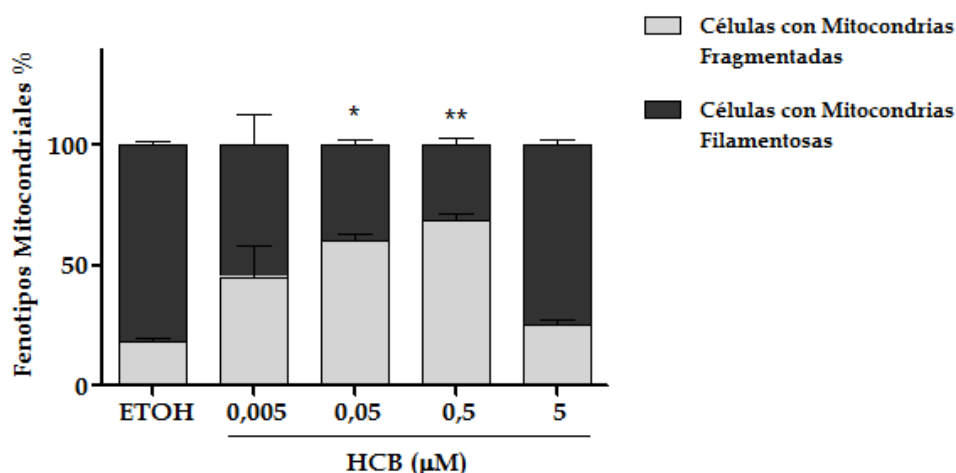


Figura 14: El HCB induce alteraciones en la morfología y pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Tinción mitocondrial con MitoTracker Red 580 de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 6 horas. Aumento 1000X. Los valores en porcentaje, representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.11. El HCB incrementa los niveles intracelulares de ROS

Los ROS son conocidos como inductores de la vía apoptótica intrínseca, a través de su interacción con proteínas del complejo de permeabilidad transitoria mitocondrial (Tsujimoto y Shimizu, 2007). Componentes del poro de permeabilidad transitoria, son blancos directos de los ROS, y sus modificaciones oxidativas producen alteraciones en el flujo aniónico a través de la mitocondria (Madesh y Hajnoczky, 2001). Más aún, un aumento transiente en la hiperpolarización de la membrana mitocondrial luego de la exposición a H_2O_2 , inicia el colapso en el $\Delta\psi\text{m}$ (Skulachev, 2006). Basados en los resultados de Almeida et al., (1997) y Ezendam et al., (2004), que demostraron que el HCB afecta la producción de ROS generando estrés oxidativo, se especuló, la posibilidad de que el HCB incrementara los niveles de ROS en las células FRTL-5, y dicho evento estuviera directamente relacionado con la inducción de la apoptosis.

La sonda DCHF fue utilizada para detectar la presencia de ROS. Este compuesto no es fluorescente cuando está reducido, pero luego de su oxidación como consecuencia de la presencia de ROS intracelular, emite fluorescencia. Los resultados demostraron que el HCB induce un aumento en los niveles intracelulares de ROS, medidos por el aumento en la fluorescencia de la sonda DCF, a las 4 horas con la dosis de 0,5 y 5 μM (530 y 455% respectivamente) (Figura 15B). La concentración 5 μM de HCB, induce aumentos en los niveles de ROS tempranamente, a partir de las 2 horas de exposición (163%), y los mismos aumentan progresivamente (3 horas: 174%, 4 horas: 402%) hasta las 5 horas, donde se observa un descenso significativo en los niveles de ROS respecto del tiempo anterior (277% vs control) (Figura 15A).

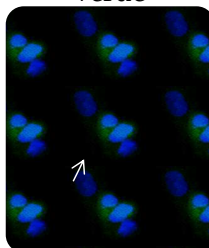
El estrés oxidativo se puede definir como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de ROS, los cuales exceden la capacidad antioxidante celular o por una disminución en la respuesta homeostática de las células, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. Con el objetivo de estudiar si el HCB afecta los niveles de expresión de las enzimas antioxidante Cu-ZnSOD (SOD1) y catalasa, las células FRLT-5 fueron tratadas a distintos tiempos (2, 6, 8 y 24 horas) y con distintas concentraciones de HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM).

Los resultados en función del tiempo de tratamiento, demostraron que el HCB 5 μM , induce una disminución en los niveles de expresión de la enzima SOD1 a las 6 horas (50 %) que luego es revertido llegando a un aumento luego de 24 horas de exposición al mismo (110 %). Los estudios en función de la dosis, fueron realizados durante 6 horas y mostraron que los niveles de expresión de SOD1 sólo disminuyen significativamente con el tratamiento con HCB 5 μM (Figuras 16A y B).

La enzima catalasa, en cambio, aumenta su expresión, por el tratamiento con HCB 5 μM , luego de 8 horas de tratamiento (108 %) y permanece elevada a las 24 horas (50 %) (Figura 17A). Los estudios en función de la dosis para la expresión de esta enzima, se realizaron a las 8 horas y demostraron un aumento dosis dependiente de los niveles de expresión de la misma (HCB 0,005 μM : 106 %; HCB 0,05 μM : 120 %; HCB 0,5 μM : 146 % y HCB 5 μM : 150 %) (Figura 17B).

La regulación en alta de los niveles de expresión de ambas enzimas antioxidantes, a las 24 horas de exposición, podría deberse principalmente a una respuesta homeostática en pos de evitar el daño celular.

DCF: Fluorescencia verde



HCB 5 μM

A

B

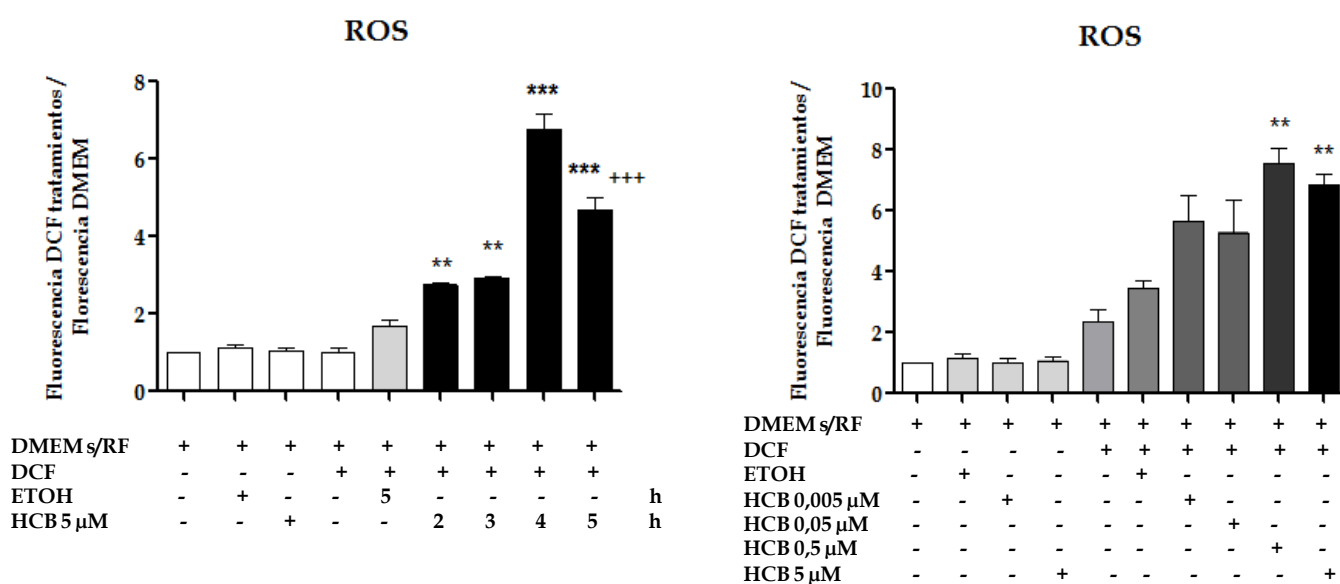


Figura 15: El HCB incrementa los niveles intracelulares de ROS. Análisis de los niveles de ROS por fluorescencia de la sonda DCF oxidada, de células FRTL-5 **(A)** tratadas durante distintos tiempos (2, 3, 4 y 5 horas) con HCB 5 μM, **(B)** tratadas con distintas dosis de HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) durante 4 horas. Las células fueron cargadas durante 30 minutos con DCHFDA (10 μM), lavadas con PBS y tratadas durante los tiempos y dosis indicadas en DMEM sin rojo fenol para evitar la interferencia con la medición de la fluorescencia. Los valores representan las medias de la fluorescencia respecto de la fluorescencia del DMEM sin rojo fenol ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01 y *** p<0,001 significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con ETOH. *** p<0,001 significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con HCB 5 μM durante 4 horas. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

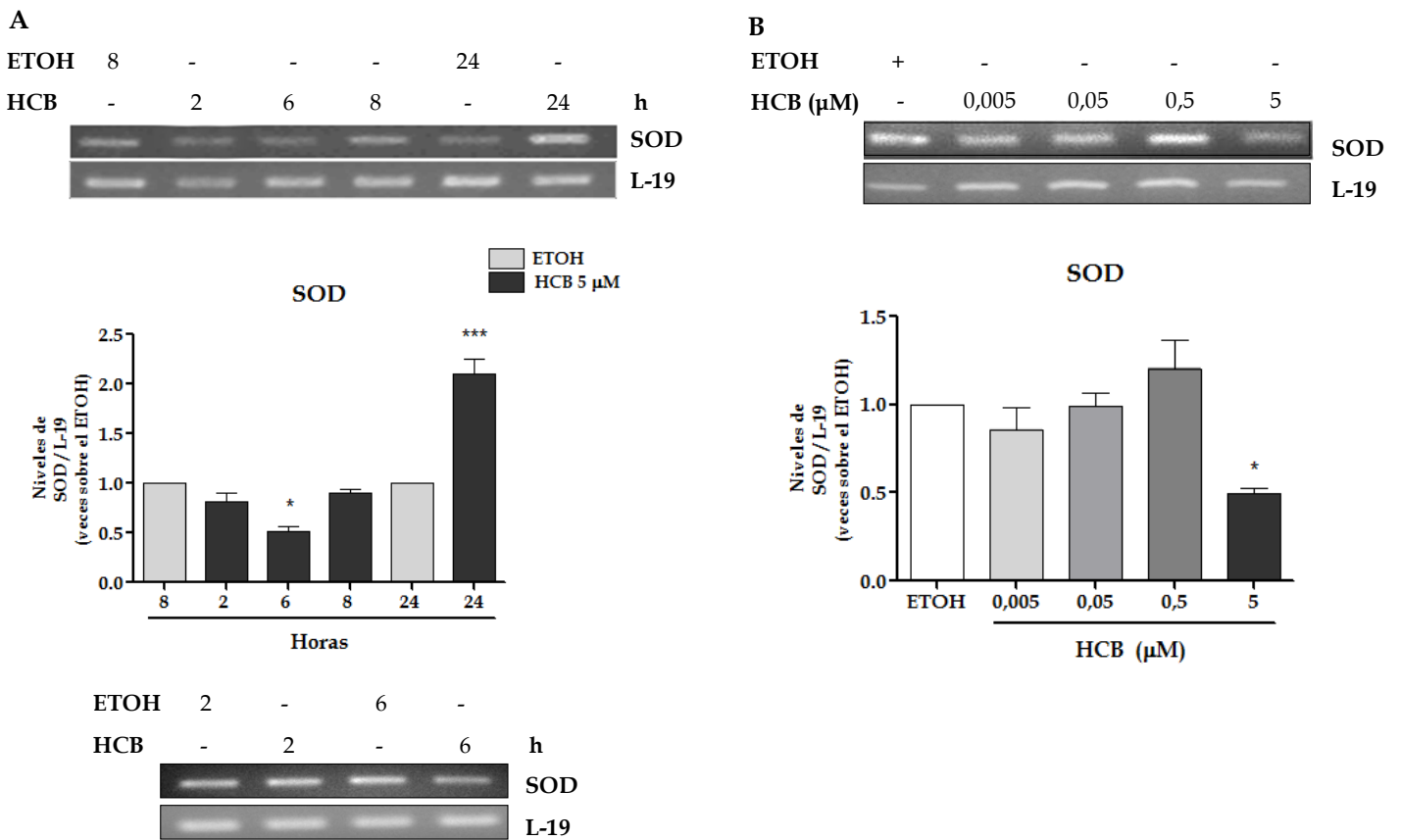


Figura 16: Efecto del HCB sobre la expresión de la enzima antioxidante SOD1. Los niveles del mRNA de la enzima antioxidante SOD fueron evaluados por RT-PCR, a partir del cDNA sintetizado del RNA total de células FRTL-5 **(A)** tratadas con HCB 5 µM durante 2, 6, 8 y 24 horas, **(B)** tratadas con HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 µM durante 6 horas. L-19 fue utilizado como control de carga. Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas a partir de las fotografías obtenidas de los geles con bromuro de etidio. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizada a L-19 y normalizadas a su control. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * p<0,05 y **p<0,01 significativamente diferentes respecto de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

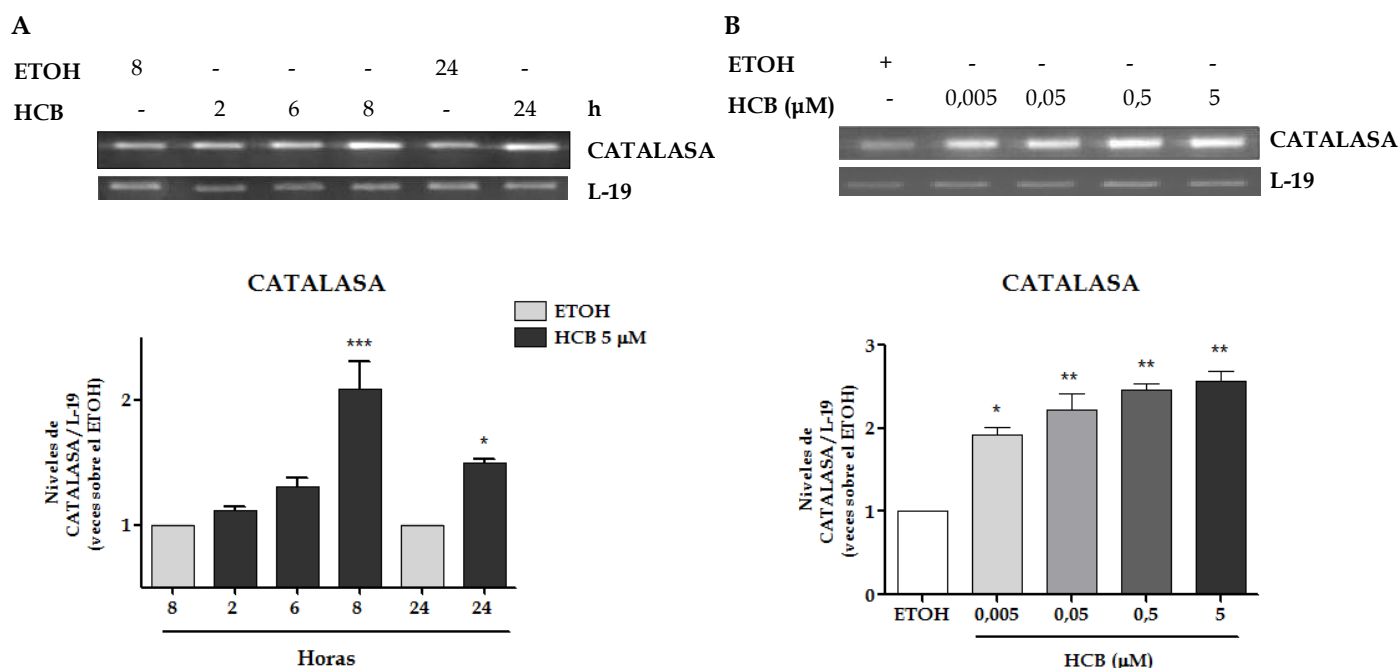


Figura 17: Efecto del HCB sobre los niveles de expresión de la enzima antioxidante catalasa. Los niveles de expresión de la enzima antioxidante catalasa fueron evaluados por RT-PCR, a partir del cDNA sintetizado del RNA total de células FRTL-5 **(A)** tratadas con HCB 5 μM durante 2, 6, 8 y 24 horas, **(B)** células tratadas con HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM durante 8 horas. L-19 fue utilizado como control de carga. Se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas a partir de las fotografías obtenidas de los geles con bromuro de etidio. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a L-19 y normalizadas a su control. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 significativamente diferentes respecto de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

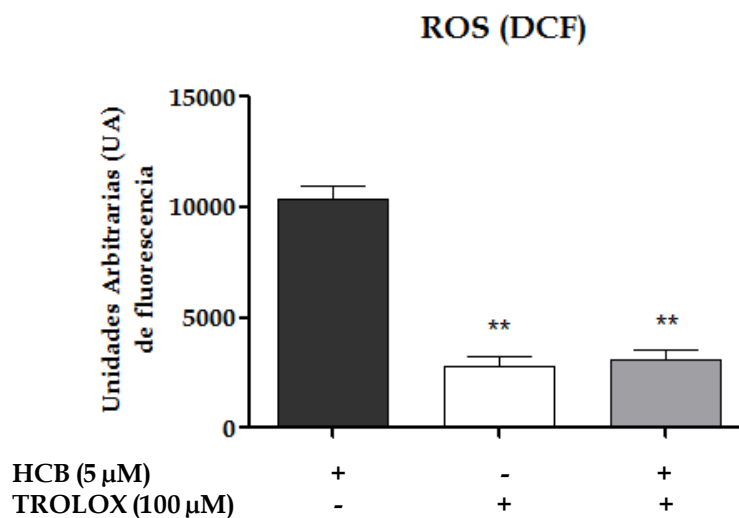
II.12. El incremento en los niveles intracelulares de ROS está involucrado en la apoptosis inducida por el HCB

Para estudiar la participación de los ROS en la apoptosis inducida por el HCB, las células FRTL-5 fueron pre-tratadas, durante 30 minutos, con TROLOX (100 y 200 μM), y luego tratadas durante 24 horas con HCB 5 μM en presencia del antioxidante. La viabilidad celular fue ensayada por MTT. La figura 18A muestra que el pre-tratamiento de las células FRTL-5 con un agente secuestrador de ROS, como es el compuesto TROLOX, evita la producción de ROS inducida por la exposición al HCB 5 μM.

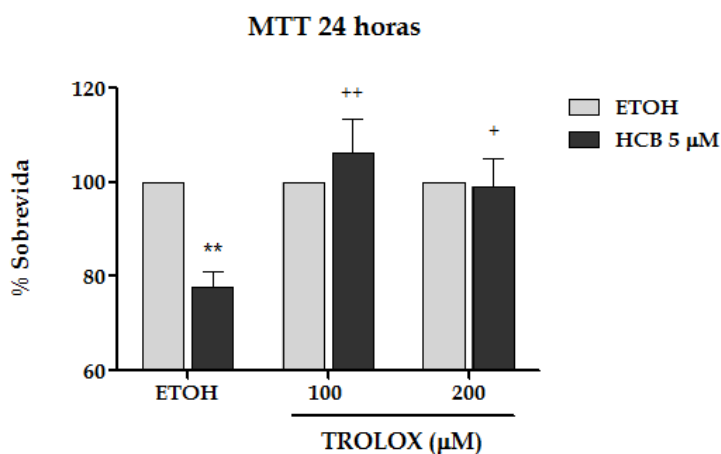
Asimismo, el pre-tratamiento con TROLOX revierte la pérdida de la viabilidad celular inducida por el tratamiento con HCB 5μM (Figura 18B). Se evaluaron también, los niveles de AIF en fracciones nucleares de células FRTL-5 pre-tratadas con TROLOX durante 30 minutos y tratadas con HCB 5 μM durante 8 horas en presencia del antioxidante. El tratamiento con TROLOX, previene la presencia del AIF en el núcleo (Figura 18C).

En conjunto, estos resultados sugieren que la generación de ROS esté involucrada en la inducción de apoptosis por el HCB.

A



B



C

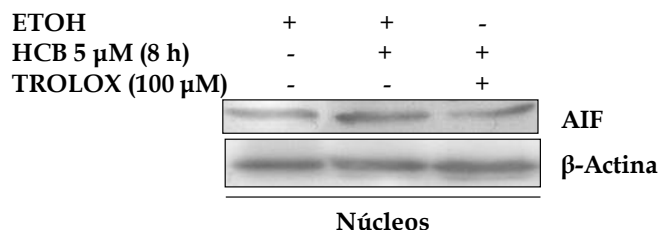


Figura 18: La producción de ROS intracelular está involucrada en la apoptosis inducida por el HCB. (A) Análisis de los niveles de ROS por fluorescencia de la sonda DCF oxidada, de células FRTL-5 tratadas HCB 5 μM o TROLOX (100 μM) durante 4 horas o pre-tratadas con TROLOX durante 30 minutos y luego tratadas en presencia del antioxidante con HCB 5 μM durante 4 horas. Las células fueron previamente cargadas con DCHFDA (10 μM) durante 30 minutos. Los pre-tratamientos y tratamientos fueron realizados en medio DMEM sin rojo fenol, para evitar la interferencia con la medición de la fluorescencia. Los valores representan las medias de la fluorescencia de las células debida al tratamiento ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01 significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con HCB 5 μM. **(B)** Análisis de la viabilidad celular de células FRTL-5 en presencia del antioxidante TROLOX. Las células FRTL-5 fueron pre-tratadas durante 30 minutos con ETOH (control) o TROLOX (100 y 200 μM), y luego tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 24 horas en presencia del antioxidante. La viabilidad celular se ensayó por el método de MTT. Los valores representan las medias del % de supervivencia respecto del ETOH ± SEM de 3 experimentos

independientes. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con ETOH y + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con HCB 5 μM . (C) Inmunodetección por Western blot de AIF en fracción nuclear de células FRTL-5 pre-tratadas durante 30 minutos con ETOH o TROLOX (100 μM) y tratadas durante 8 horas en presencia del antioxidante con HCB 5 μM . Análisis estadístico: ANOVA de uno y dos factores, respectivamente, con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey (ANOVA de un factor) y Bonferroni (ANOVA de dos factores) para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.13. EL HCB induce la activación de las vías de señalización de MAPKs en las células FRTL-5

Los ROS y subsecuente estrés oxidativo, inducen numerosas vías de transducción de señales, las cuales pueden llevar, finalmente, a la protección contra el daño oxidativo o a la muerte por apoptosis, dependiendo del tipo y contexto celular. Dentro de las múltiples vías de transducción de señales activadas por los ROS, se encuentran las vías de MAPKs.

Para estudiar el efecto del HCB sobre la activación de las MAPKs, las células FRTL-5 fueron tratadas a distintos tiempos (2, 6, 8, 24 y 48 horas) y con distintas dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) del tóxico. Luego del tratamiento los lisados celulares fueron analizados por Western blot, con anticuerpos específicos anti ERK1/2, JNK y p38, contra sus formas fosforiladas y totales.

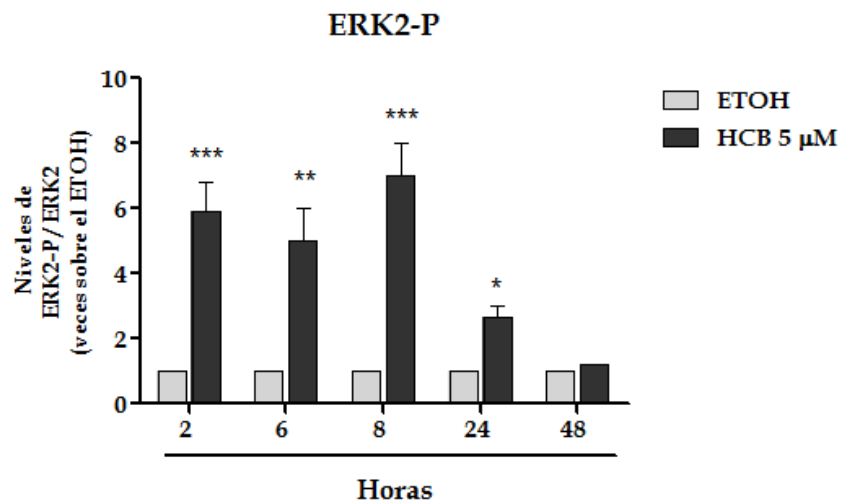
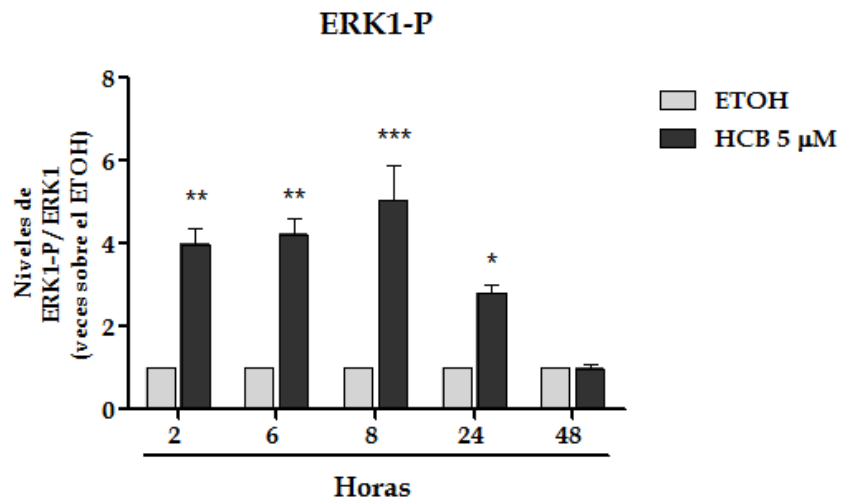
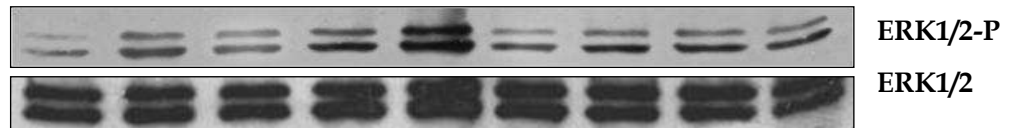
Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con HCB induce una activación significativa de las MAPKs, ERK1/2 y SAPK-JNK, tanto en función del tiempo como de la dosis de tratamiento (Figura 19A y B y Figura 20A y B). La activación de ERK1/2 se induce de manera sostenida en el tiempo. Tanto ERK1, como ERK2 poseen similares perfiles de activación. El incremento en la fosforilación comienza a las 2 horas (ERK1: 300 % y ERK2: 490 %), y persiste sostenidamente hasta las 24 horas de tratamiento (ERK1: 180 % y ERK2: 165 %) (Figura 19A), aunque con valores menores respecto de tiempos más cortos. Los ensayos en función de la dosis se realizaron durante 8 horas de exposición al HCB, tiempo al cual fue máxima la activación de ERK1 y ERK2 (410% y 600 % respectivamente). Los resultados muestran que la fosforilación de ERK1/2, aumenta de manera dosis dependiente (HCB 0,5 μM : 400% y HCB 5 μM : 500%) (Figura 19B).

La fosforilación de JNK-2/3 es incrementada a las 6 y 8 horas (82 y 81% respectivamente) de exposición al HCB 5 μM . La activación de la JNK-1, se induce más tempranamente (160, 130 y 150 %), a las 2, 6 y 8 horas post-tratamiento con HCB 5 μM (Figura 20A). Los ensayos en función de la dosis, fueron realizados durante 8 horas de exposición y mostraron aumentos de la activación de JNK1, dependientes de la concentración de HCB (HCB 0,05 μM : 200 %; HCB 0,5 μM : 75 % y HCB 5 μM : 130 %) (Figura 20B).

No se observaron alteraciones en la fosforilación de p38 a ningún tiempo a partir de las 2 horas de exposición, al HCB 5 μM , en adelante (Figura 21). No obstante, la exposición a dosis menores del tóxico (0,05 y 0,5 μM) si produjo incrementos significativos (210 y 105 % respectivamente) en la activación de esta MAPK (Figura 21B). Estudios a tiempos menores de exposición, demostraron que la p38 es activada de manera transiente a los 15 minutos (100 %) por el HCB 5 μM , sin embargo dicha activación no persiste a lo largo del tiempo (Figura 21C).

A

| | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|---|
| ETOH | 2 | - | 8 | - | - | 24 | - | 48 | - | |
| HCB | - | 2 | - | 6 | 8 | - | 24 | - | 48 | h |



B

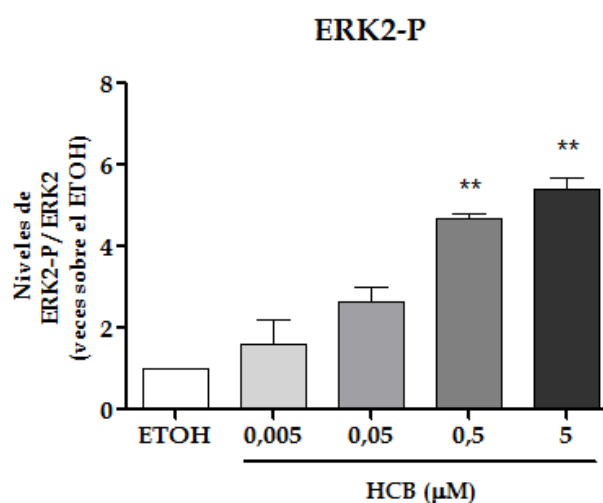
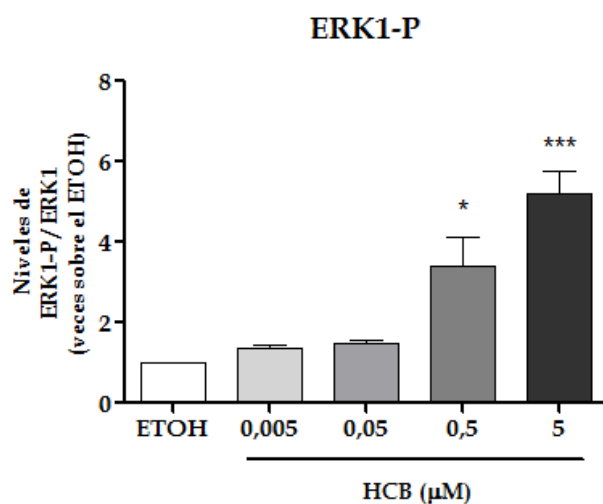
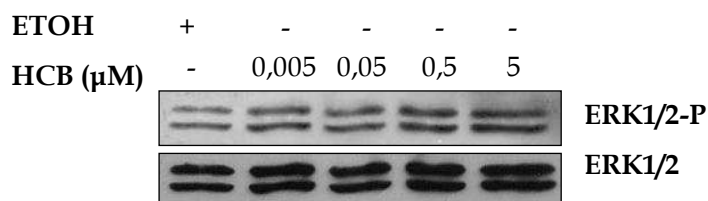
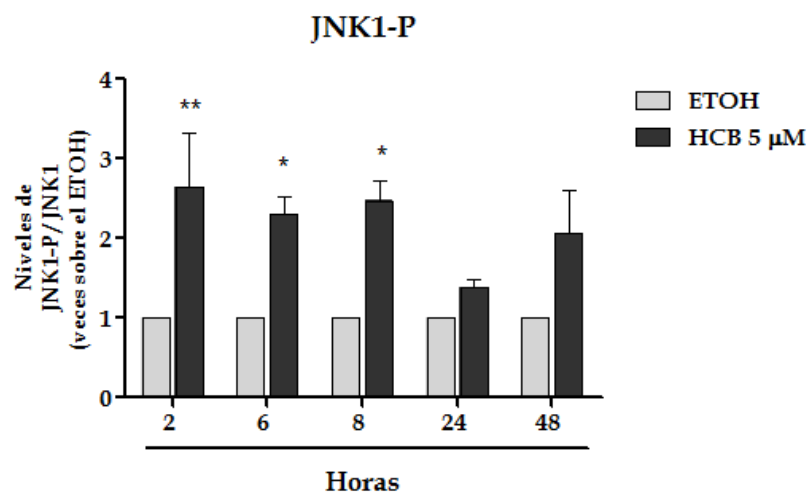
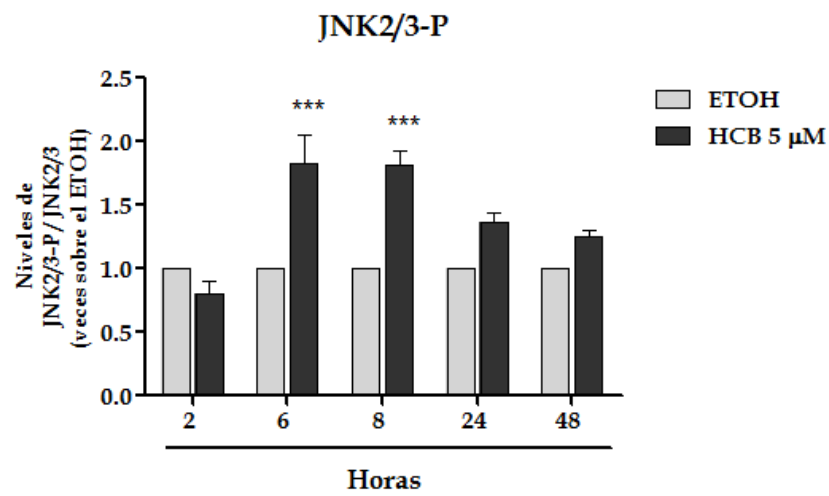
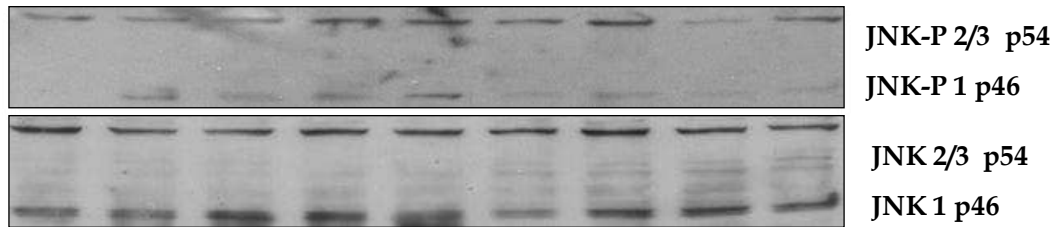


Figura 19: El HCB induce la activación de la vía de señalización de ERK1/2 en células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de ERK1/2-P y ERK1/2 en lisado total de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 8 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

A

| | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|---|
| ETOH | 2 | - | 8 | - | - | 24 | - | 48 | - | |
| HCB | - | 2 | - | 6 | 8 | - | 24 | - | 48 | h |



B

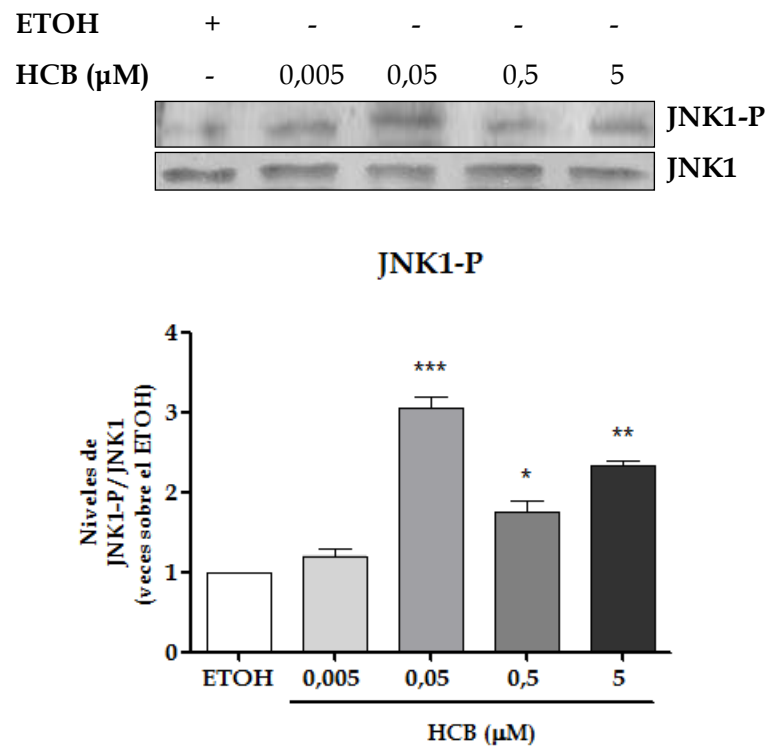
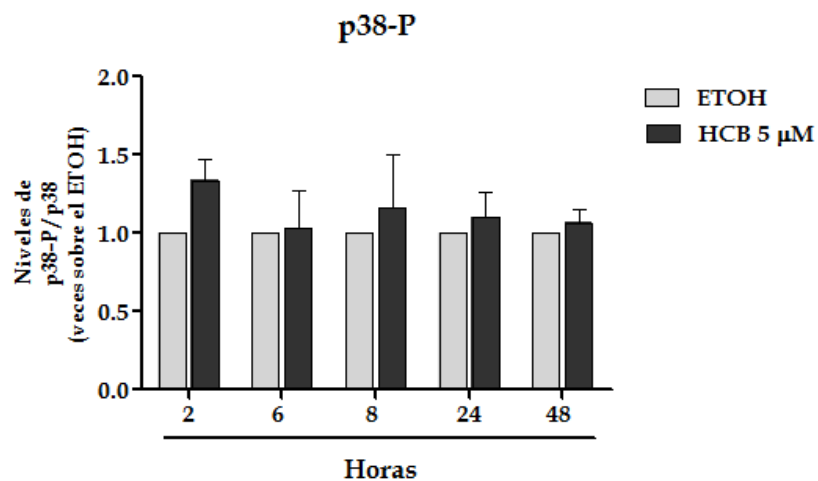
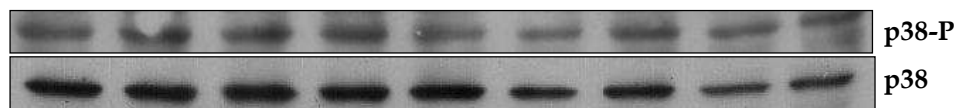


Figura 20: El HCB induce la activación de la vía de señalización de SAPK-JNK en células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de JNK1/2/3-P y JNK1/2/3 en lisado total de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM , durante 8 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

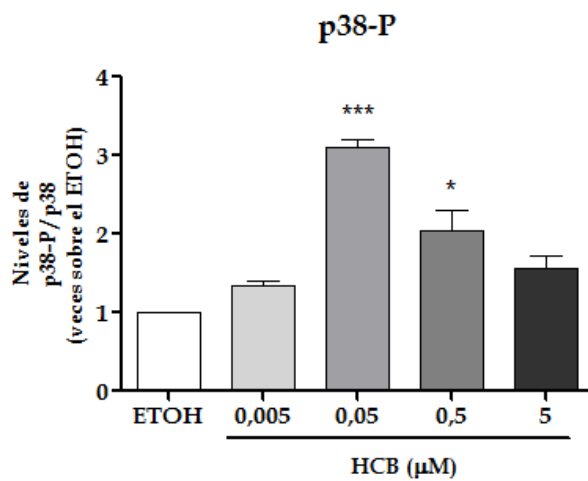
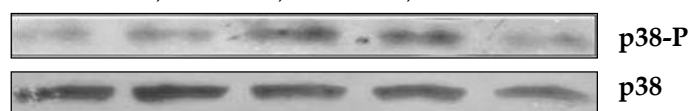
A

| | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| ETOH | 2 | - | 8 | - | - | 24 | - | 48 | - |
| HCB | - | 2 | - | 6 | 8 | - | 24 | - | 48 |
| | | | | | | | | | h |



B

| | | | | | |
|----------------|---|-------|------|-----|---|
| ETOH | + | - | - | - | - |
| HCB (μ M) | - | 0,005 | 0,05 | 0,5 | 5 |



C

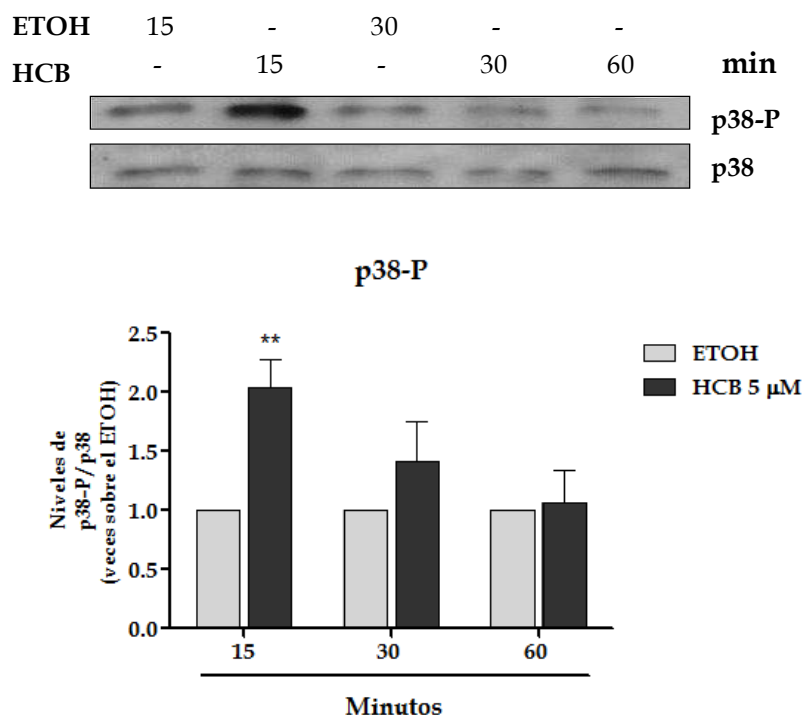


Figura 21: El HCB induce la activación transiente de la vía de señalización de p38 en células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de p38-P y p38 en lisado total de células FRTL-5, (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 6, 8, 24 y 48 horas, (B) tratadas con ETOH o HCB 0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM, durante 8 horas. (C) Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de p38-P y p38 en lisado total de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 15, 30 y 60 minutos. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β-Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias ± SEM de 3 experimentos independientes. * p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,01, significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.14. La activación de ERK1/2 está involucrada en la apoptosis inducida por el HCB en las células FRTL-5

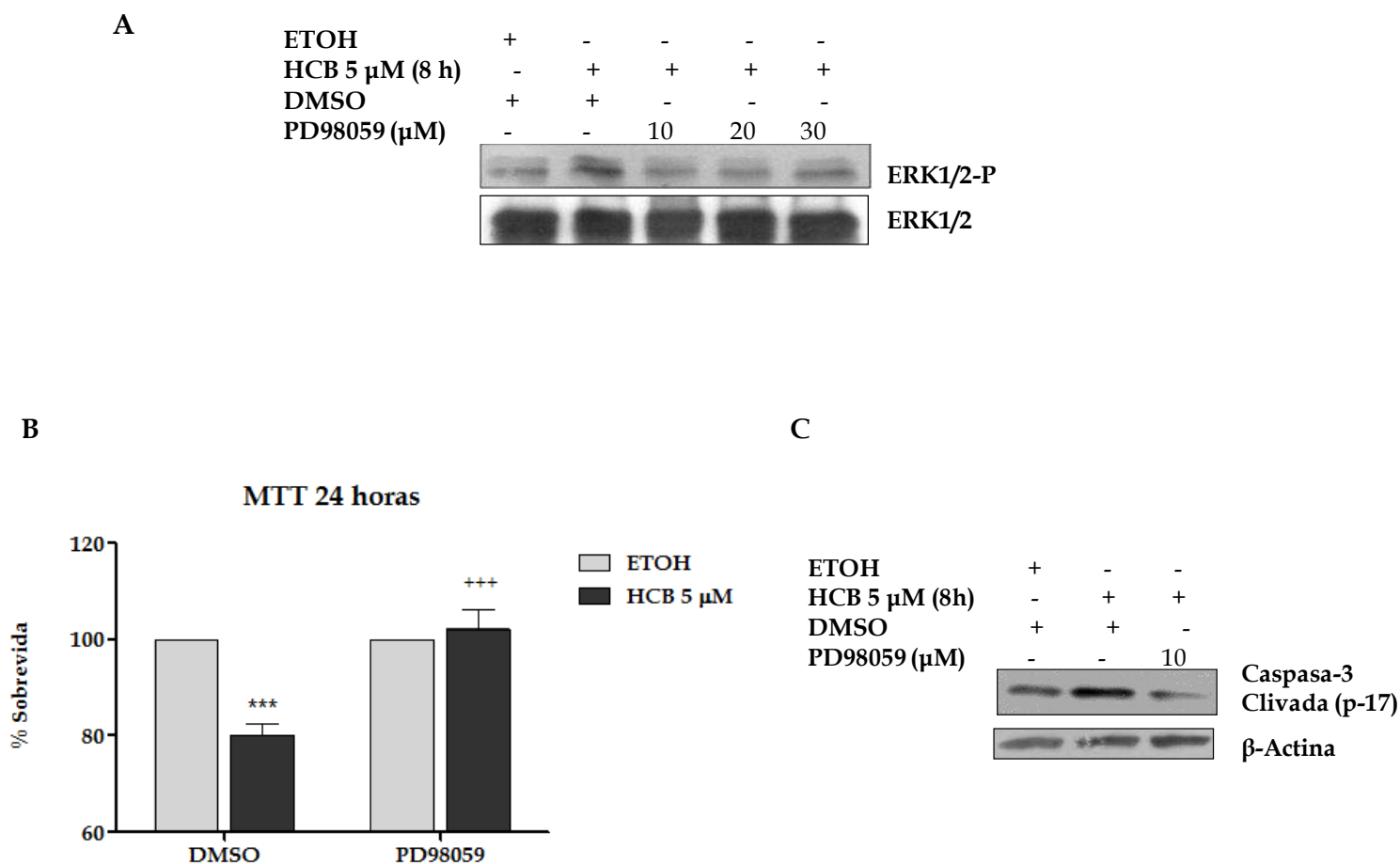
Durante muchos años, la activación de ERK1/2 ha sido directamente relacionada con la proliferación, supervivencia celular y la inhibición de la apoptosis, sin embargo, estudios recientes demostraron que una activación sostenida de ERK1/2 en respuesta a estrés, estaría involucrada, en la inducción de la apoptosis (Lee et al., 2005).

Con el objetivo de verificar la participación de ERK1/2 en la apoptosis inducida por el HCB, las células FRTL-5 fueron pre-tratadas con el inhibidor de MEK1, PD98059, durante 1 hora y la viabilidad celular fue ensayada por MTT, luego de 24 horas de exposición al HCB 5 μM en presencia del inhibidor.

La Figura 22A muestra el efecto del pre-tratamiento con distintas dosis del inhibidor PD98059 (10, 20 y 30 μM), sobre la fosforilación de ERK1/2, en células tratadas con HCB 5 μM durante 8 horas (pico de activación de ERK1/2, Figura 19A). Los niveles proteicos, evaluados por Western blot de los lisados celulares, muestran que el PD98059 10 μM , produce el máximo descenso en la fosforilación del ERK1/2, debido a la inhibición de MEK1, inclusive por debajo de los niveles basales.

La pérdida de viabilidad celular, inducida por el HCB 5 μM , es dependiente de la activación de ERK1/2, como se demuestra en la Figura 22B, dado que la misma se restablece en presencia del inhibidor PD98059 (10 μM). Estos resultados demuestran claramente la participación de la vía de señalización de ERK1/2 en la apoptosis inducida por el HCB.

Para confirmar el resultado se evaluaron los niveles de la caspasa-3 clivada (p-17), por Western blot, y se observó que el tratamiento con el inhibidor, retorna los niveles de caspasa-3 clivada a los valores controles (Figura 22C).



del inhibidor. **(B)** Análisis de la viabilidad celular por MTT de células pre-tratadas con DMSO o PD98059 (10 μ M) y tratadas durante 24 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. **(C)** Inmunodetección por Western blot de la caspasa-3 activa en lisado total de células FRTL-5 pre-tratadas con DMSO o PD98059 (10 μ M) y tratadas durante 8 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. Los valores representan las medias del % de supervivencia respecto del control \pm SEM de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con ETOH y +++ $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores del tratamiento con HCB 5 μ M. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Bonferroni para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.15. La activación de JNK, no está involucrada en la inducción de apoptosis por el HCB en células FRTL-5

La JNK es un importante regulador de numerosos eventos celulares, incluyendo la apoptosis. Se ha demostrado que la activación prolongada de JNK contribuye a la muerte celular inducida por TNF- α , sin embargo numerosos estudios revelan que JNK puede actuar también como supresor de la apoptosis, es decir que posee tanto funciones pro- como anti-apoptóticas, dependiendo del tipo celular, la naturaleza del estímulo de muerte, y la duración de su activación (Jing y Anning, 2005).

Para evaluar el rol de JNK en la apoptosis inducida por el HCB, se evaluó la viabilidad de células FRTL-5 pre-tratadas, durante 1 hora, con un inhibidor específico de dicha quinasa, SP600125 y tratadas durante 24 horas con HCB (5 μ M) en presencia del inhibidor.

Se evaluaron distintas dosis del inhibidor (25 y 50 μ M), analizando la fosforilación de c-jun, sustrato específico de JNK. Se eligió la dosis de 50 μ M para realizar la determinación de la viabilidad celular, dado que llevaba los niveles de c-jun-P a valores control (Figura 23A). Los resultados mostraron que aún en presencia del inhibidor, SP600125, el HCB era capaz de inducir una pérdida en la viabilidad celular en las células FRTL-5 (Figura 23B). El SP600125, por sí mismo, no inducía una disminución en el porcentaje de supervivencia, en dichas células (Figura 23C). Estos resultados demuestran que JNK, no se encuentra involucrado en la inducción de apoptosis por el HCB.

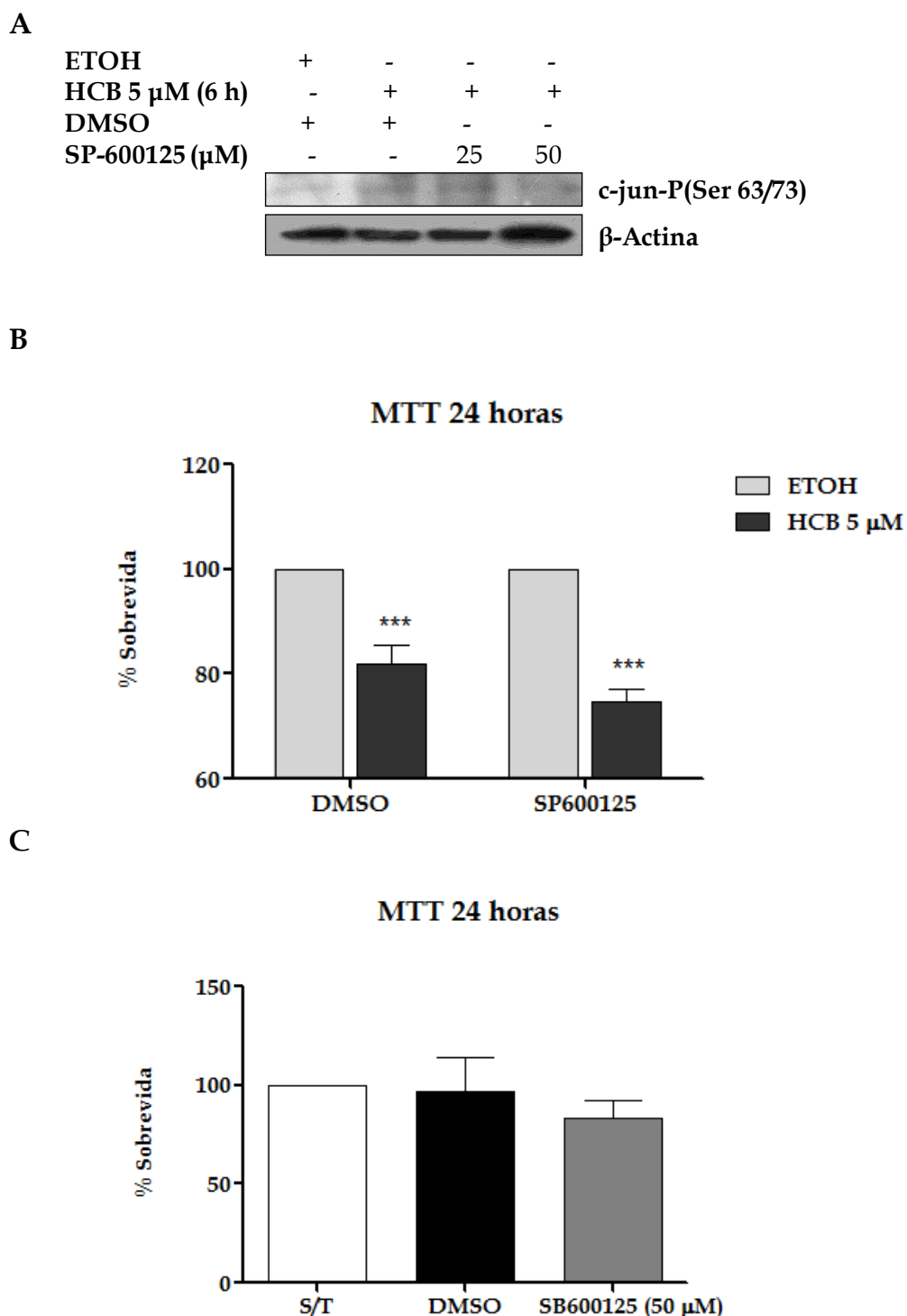


Figura 23: La activación de JNK, no está involucrada en la inducción de apoptosis por el HCB en células FRTL-5. **(A)** Inmunodetección por Western blot de c-jun-P y β -Actina, en lisado total de células FRTL-5 pre-tratadas durante 1 hora con DMSO o distintas dosis de SP600125 (25 y 50 μ M), inhibidor específico de la JNK, y tratadas durante 6 horas con ETOH o HCB 5 μ M en presencia del inhibidor. **(B)** Análisis de la viabilidad celular por MTT de células pre-tratadas con DMSO o SP600125 (50 μ M) y tratadas durante 24 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. **(C)** Análisis de la viabilidad celular por MTT de células sin tratamiento (S/T), tratadas con DMSO o SP600125 (50 μ M) durante 24 horas. Los valores representan las medias del % de supervivencia respecto del control \pm SEM de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis

estadístico: ANOVA de dos factores y ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Bonferroni y Tukey respectivamente, para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.16. La activación de p38 MAPK, no está involucrada en la inducción de apoptosis por el HCB en células FRTL-5

De manera similar a JNK, la p38 MAPKs es predominantemente activada por estímulos de estrés celular y puede estar involucrada tanto en mecanismo pro- como anti-apoptóticos. Con el objetivo de determinar la participación de p38 MAPK en la apoptosis inducida por el HCB se evaluó la viabilidad de células FRTL-5 pre-tratadas con el inhibidor específico de p38 MAPK, SB203580, durante 1 hora. La viabilidad celular fue ensayada por el ensayo de MTT luego de 24 horas de exposición al HCB (5 μ M) en presencia del inhibidor. Los resultados demostraron que el tratamiento con el inhibidor específico SB203580 (10 μ M) inhibió la fosforilación de p38 MAPK (Figura 24A), sin embargo, no fue capaz de restaurar la viabilidad celular (Figura 24B). El inhibidor SB203580 (10 μ M), per se, no indujo un efecto citotóxico en esta línea celular (Figura 24C).

Estos resultados demuestran que el HCB induce pérdida de viabilidad en células FRTL-5, por un mecanismo independiente de la activación de p38 MAPK.

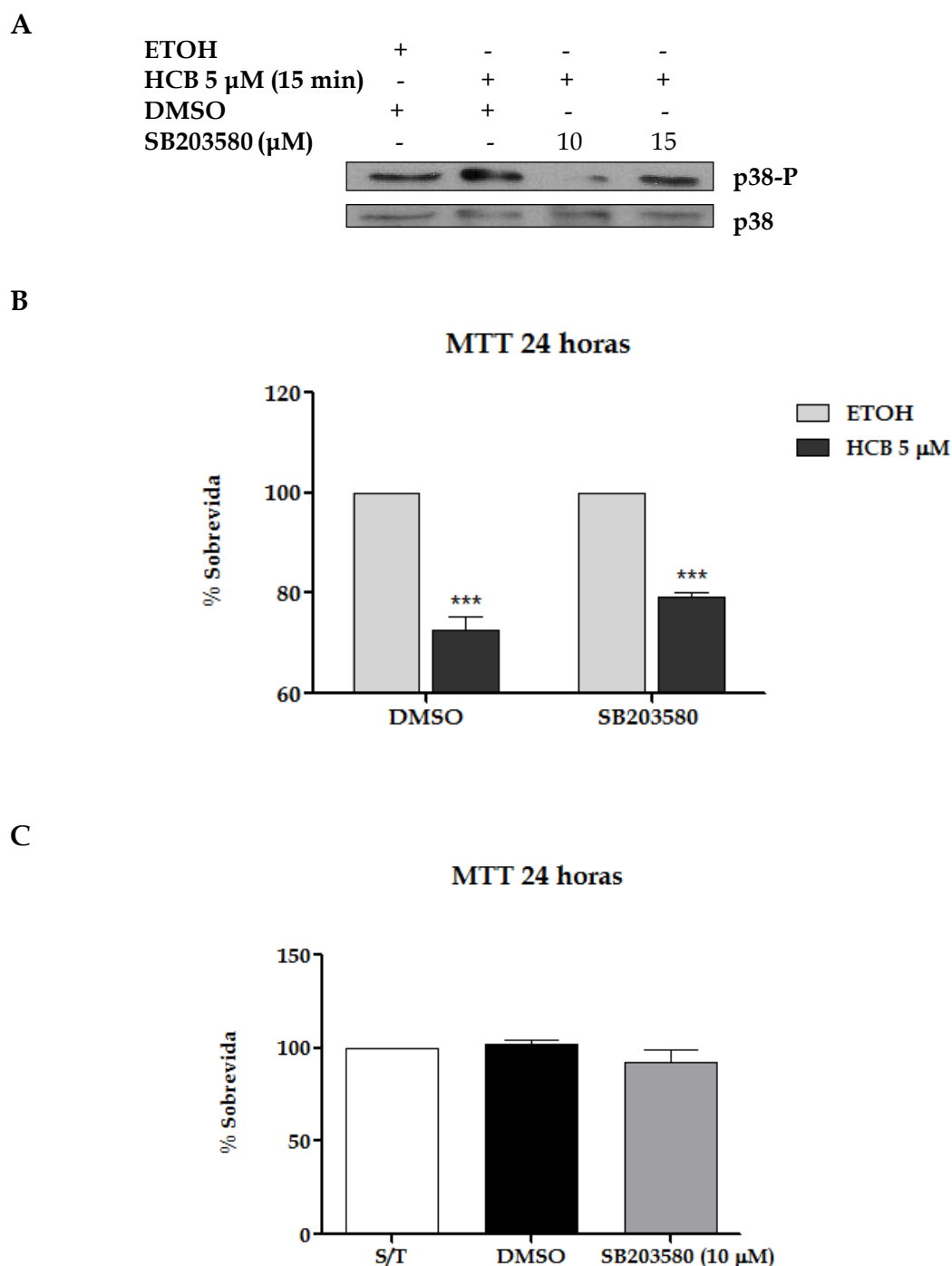


Figura 24: La activación de p38, no está involucrada en la inducción de apoptosis por el HCB en células FRTL-5. **(A)** Inmunodetección por Western blot de p38-P y p38, en lisado total de células FRTL-5 pre-tratadas durante 1 hora con DMSO o distintas dosis de SB203580 (10 y 15 μ M), y tratadas durante 15 minutos con ETOH o HCB 5 μ M en presencia del inhibidor. **(B)** Análisis de la viabilidad celular por MTT de células pre-tratadas con DMSO o SB203580 (10 μ M) y tratadas durante 24 horas con ETOH o HCB 5 μ M, en presencia del inhibidor. **(C)** Análisis de la viabilidad celular por MTT de células sin tratamiento (S/T), tratadas con DMSO o SB203580 (10 μ M) durante 24 horas. Los valores representan las medias del % de supervivencia respecto del control \pm SEM de 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores y ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Bonferroni y Tukey respectivamente, para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

II.17. La activación de ERK1/2 inducida por el HCB es dependiente de la generación de ROS

Numerosos trabajos reportan una fuerte correlación entre la activación sostenida de MAPKs, y el aumento en la producción intracelular de ROS, como resultado del tratamiento con distintos agentes citotóxicos (Wang et al., 2000; Kim et al., 2005).

Con el objetivo de estudiar el rol de los ROS en la activación de ERK1/2 inducida por el HCB, se evaluó la fosforilación del ERK1/2 por Western blot en lisados totales, y en fracciones nucleares de células FRTL-5 pre-tratadas con TROLOX y tratadas durante 8 horas con HCB 5 μ M en presencia del antioxidante. Como se muestra en la Figura 24, el tratamiento con el antioxidante, atenuó la fosforilación de ERK1/2 en el lisado total y la abolió completamente en la fracción nuclear. Estos resultados demuestran que la activación de ERK1/2 es un evento que ocurre río abajo de la generación de ROS.

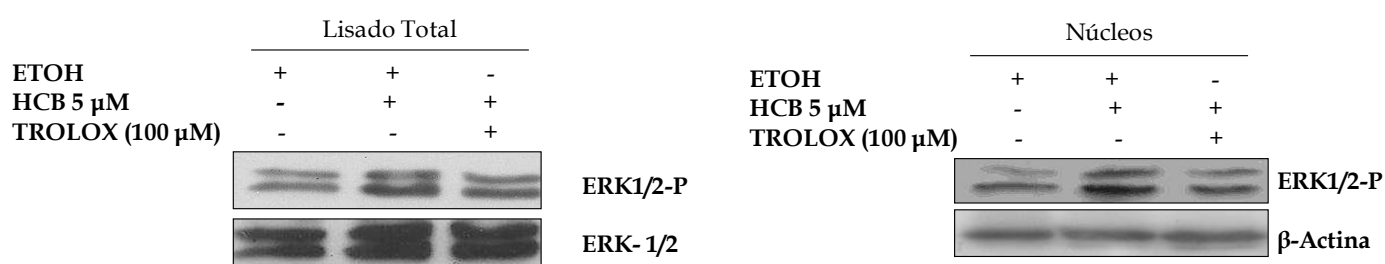


Figura 25: La activación de ERK1/2 inducida por el HCB es dependiente de la generación de ROS. Inmunodetección por Western blot de ERK1/2-P y ERK1/2 y en lisado total y de ERK-P y β -Actina en fracción nuclear de células FRTL-5 pre-tratadas durante 1 hora con ETOH o TROLOX (100 μ M), y tratadas durante 8 horas con ETOH o HCB 5 μ M en presencia del antioxidante.

II.18. El HCB induce alteraciones en los niveles intracelulares de las proteínas reguladoras del ciclo celular: p27^{Kip1}, y Ciclina D1

Basados en el hecho de que el HCB estimula la producción de TGF- β 1, y en los antecedentes de la literatura que indican un rol de esta citoquina sobre la inhibición del ciclo celular a través de la alteración en los niveles de proteínas regulatorias del ciclo, como ciclina D, ciclina E y CDK4, y a través de la acción de los CKIs como, p27 y p21 (Saltis, 1996), especulamos que dicho tóxico podría, sumado a su efecto proapoptótico, inducir un efecto inhibitorio sobre la progresión del ciclo celular. Para probar dicha hipótesis, se determinó el efecto del HCB sobre los niveles de proteínas regulatorias del ciclo celular p27 y Ciclina D1.

La proteína p27 es un miembro de la familia de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) CIP/KIP, cuya función es regular de manera negativa la progresión del ciclo celular.

En la Figura 26 se observa un aumento significativo en los niveles proteicos de p27, en lisados celulares totales, de células FRTL-5 expuestas durante 6 y 8 horas al HCB 5 μM (258 y 132 % respectivamente).

Sin embargo, la actividad de la p27, no sólo es controlada a través de la regulación de sus niveles proteicos, sino también a través de su localización subcelular. Para exhibir su función inhibitoria, la p27 necesita localizarse en el núcleo. Debido a esto, evaluamos la presencia de dicha proteína en fracciones citosólicas y nucleares de células FRTL-5 tratadas con distintas concentraciones de HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) y durante distintos tiempos de exposición (2, 4, 6, 24 y 30 horas). En la Figura 27A, se observan incrementos en los niveles proteicos de p27, en ambos compartimentos subcelulares como consecuencia del tratamiento con HCB 5 μM . Los resultados sugieren que p27 podría inhibir tempranamente la progresión del ciclo celular, dado que sus niveles nucleares se mantienen elevados durante 2, 4 y 6 horas como consecuencia del tratamiento con HCB 5 μM (165, 114 y 96 %, respectivamente). Sin embargo, dicho efecto parece atenuarse a medida que transcurre el tiempo de tratamiento, observándose traslocación de p27 desde el núcleo hacia el citosol celular.

Los resultados en función de la dosis se realizaron a las 6 horas y reflejaron aumentos significativos de p27 tanto en fracciones citosólicas como nucleares en todas las dosis ensayadas (Figura 27B). Es interesante observar que tanto en la fracción citosólica como en la nuclear, las curvas son de tipo campana invertida. Resultados de nuestro y otros laboratorios, han demostrado que los disruptores endócrinos pueden ejercer este tipo de efecto en función de la dosis (Randi et al., 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

La ciclina D1, es esencial para la iniciación del ciclo celular, controlando la transición de G1/S, a través de su interacción con CDK4/6. La Figura 28 muestra que la presencia de esta proteína en el núcleo disminuye progresivamente con la exposición al HCB 5 μM (4 horas: 40%; 6 horas: 50 %; 24 horas: 60% y 30 horas: 80 %).

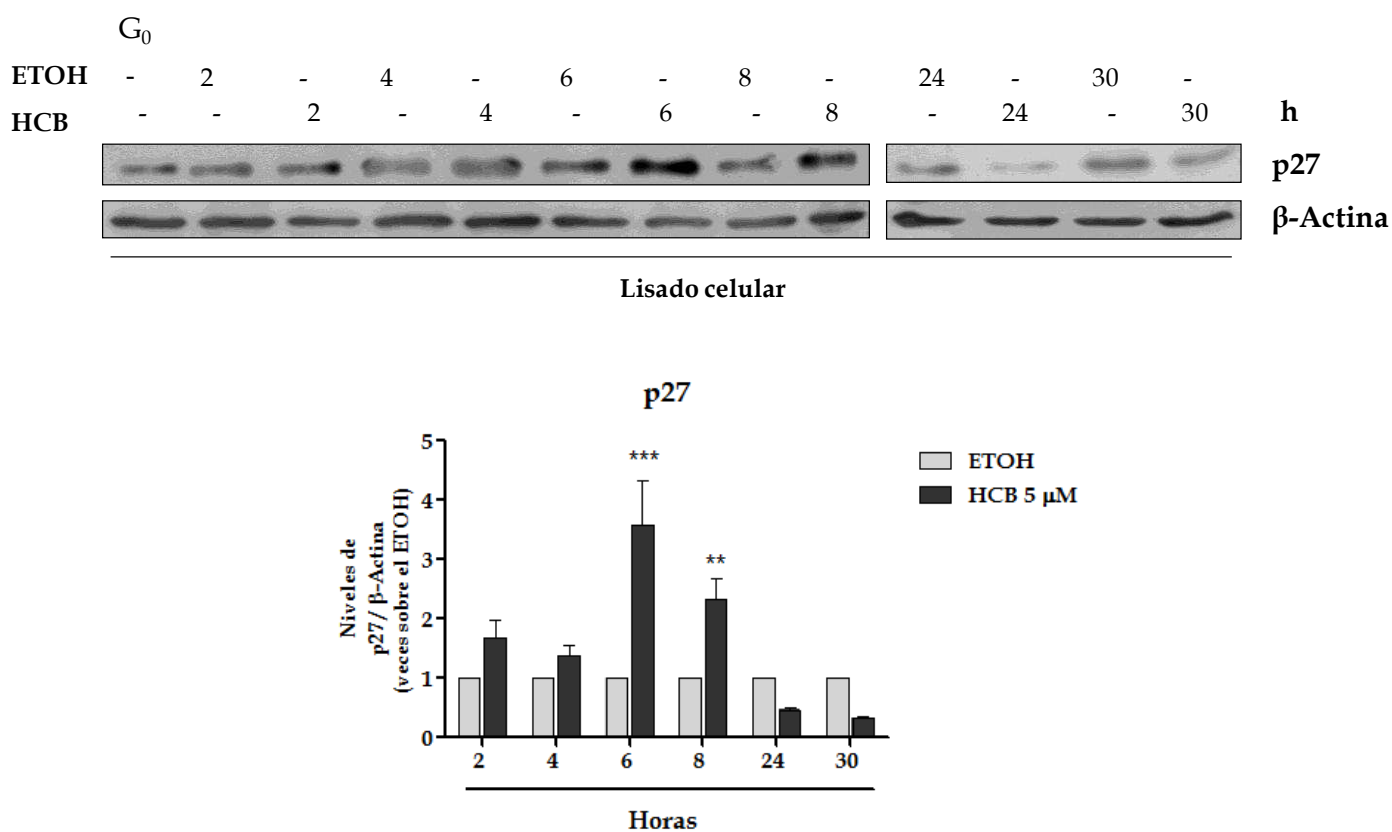
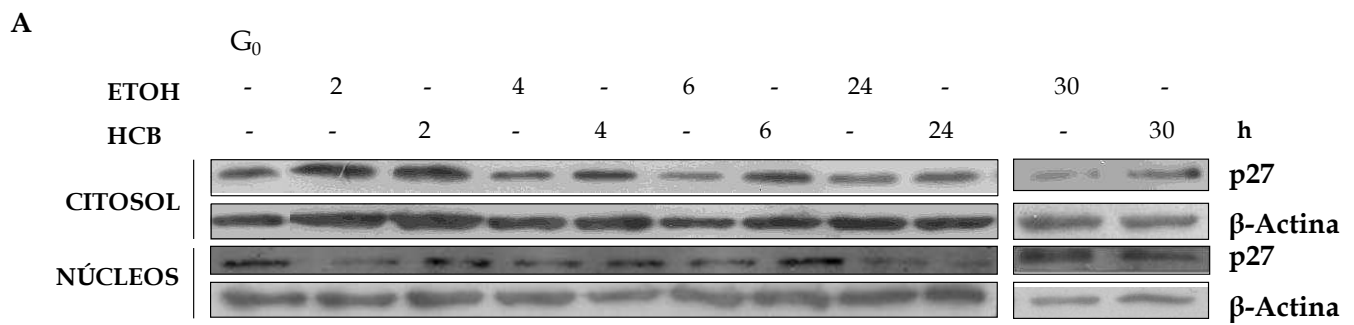
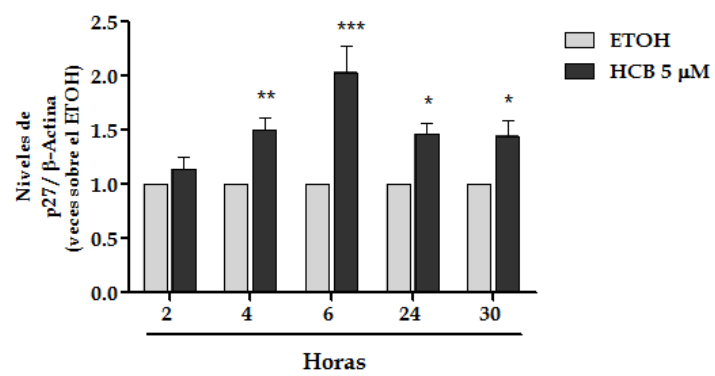


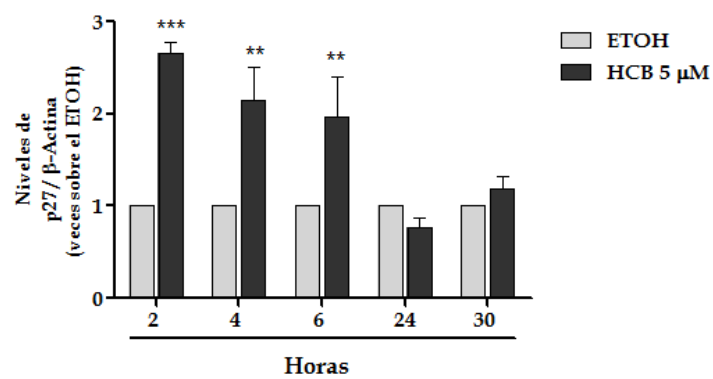
Figura 26: El HCB altera los niveles proteicos de p27. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de p27 y β-Actina en lisado total de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 4, 6, 8, 24 y 30 horas, luego de 24 horas de privación de nutrientes (G₀). Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β-Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01 y *** p<0,001 significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.



p27 Citosólico



p27 Nuclear



B

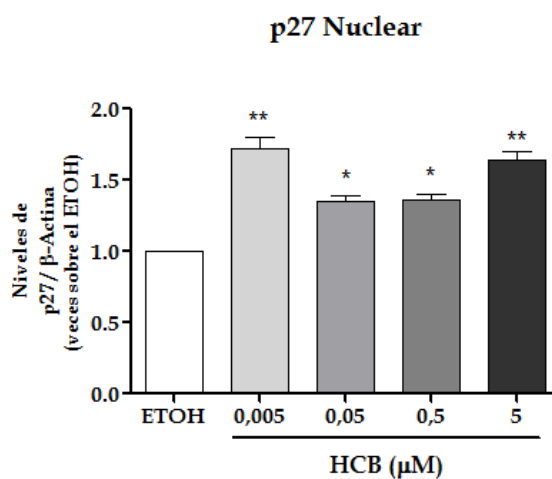
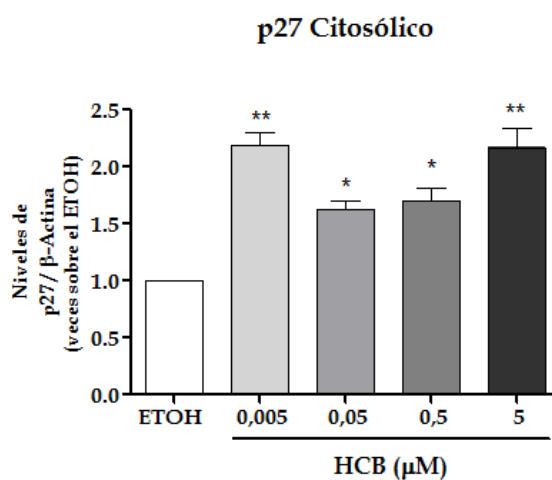
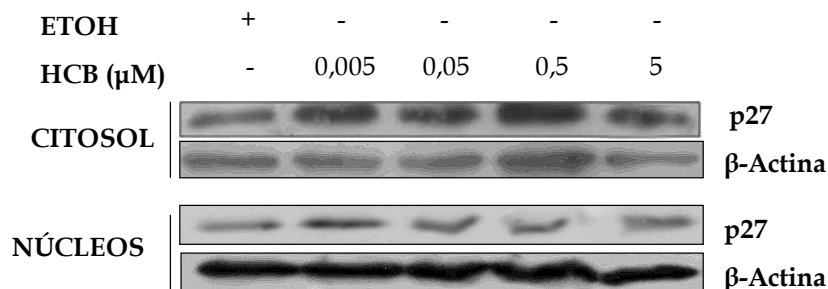


Figura 27: El HCB altera la localización subcelular de la proteína p27. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de p27 y β -Actina en fracciones citosólicas y nucleares de células FRTL-5 (A) tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 4, 6, 24 y 30 horas, luego de 24 horas de privación de nutrientes (Go), (B) tratadas con HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM), durante 6 horas. Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β -Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,01$ significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales.

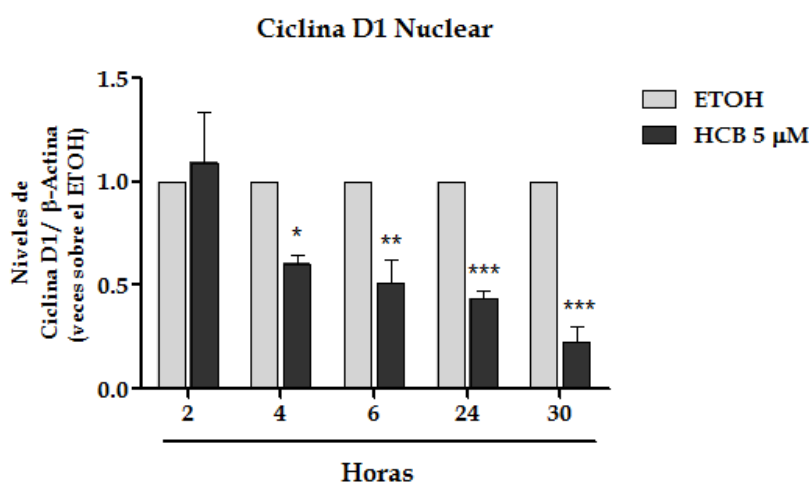
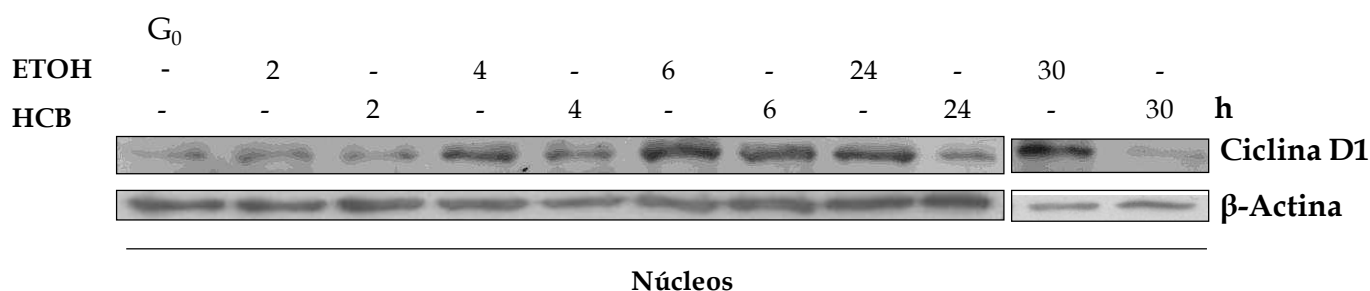


Figura 28: El HCB altera los niveles de la ciclina D1 en núcleo de células FRTL-5. Inmunodetección por Western blot y cuantificación densitométrica de las bandas reactivas de ciclina D1 y β-Actina en núcleos de células FRTL-5 tratadas con ETOH o HCB 5 μM durante 2, 4, 6, 8, 24 y 30 horas, luego de 24 horas de privación de nutrientes (Go). Las densidades ópticas de las bandas fueron cuantificadas, relativizadas a la β-Actina y normalizadas a su control. Los valores representan las medias ± SEM de 3 experimentos independientes. * p<0,05, ** p<0,01 y *** p<0,001 significativamente diferentes respecto de los valores de los tratamientos con ETOH. Análisis estadístico: ANOVA de un factor con un intervalo de confianza del 95%, seguido de post test de Tukey para identificar las diferencias significativas entre grupos experimentales

II.19. Efecto de HCB sobre el ciclo celular de células FRTL-5

Con el objetivo de determinar si las alteraciones en los niveles de proteínas regulatorias del ciclo celular, estaban relacionadas con un arresto del mismo, se realizó un análisis de la distribución de células FRTL-5, en cada fase del ciclo por citometría de flujo. Las células fueron tratadas durante 24 y 72 horas con ETOH o HCB 5 μM en medio completo, es decir, en presencia de suero y complementado con hormonas, luego de 24 horas de privación de nutrientes. El tratamiento con HCB 5 μM induce una acumulación de células en fase G₂/M y G₁ del ciclo celular en función del tiempo de tratamiento. A las 24 horas de tratamiento se observó un aumento de células en fase G₂/M, desde un 10,4 % (ETOH), a un 17,2 % (HCB 5 μM). Al mismo tiempo la población de células en fase S disminuyó de un 46,8 % (ETOH) a un 38 % (HCB 5 μM).

μM). Exposiciones al tóxico más prolongadas (72 horas), provocaron aumentos en la fase G_1 del ciclo, desde un 43,5 % (ETOH), a un 58 % (HCB 5 μM), en detrimento de una marcada disminución en la población de células en fase S, desde un 44,1 % (ETOH) a un 26,4 % (HCB 5 μM) (Figura 29). Estos resultados sugieren un posible efecto inhibitorio del HCB sobre el ciclo celular de células FRTL-5.

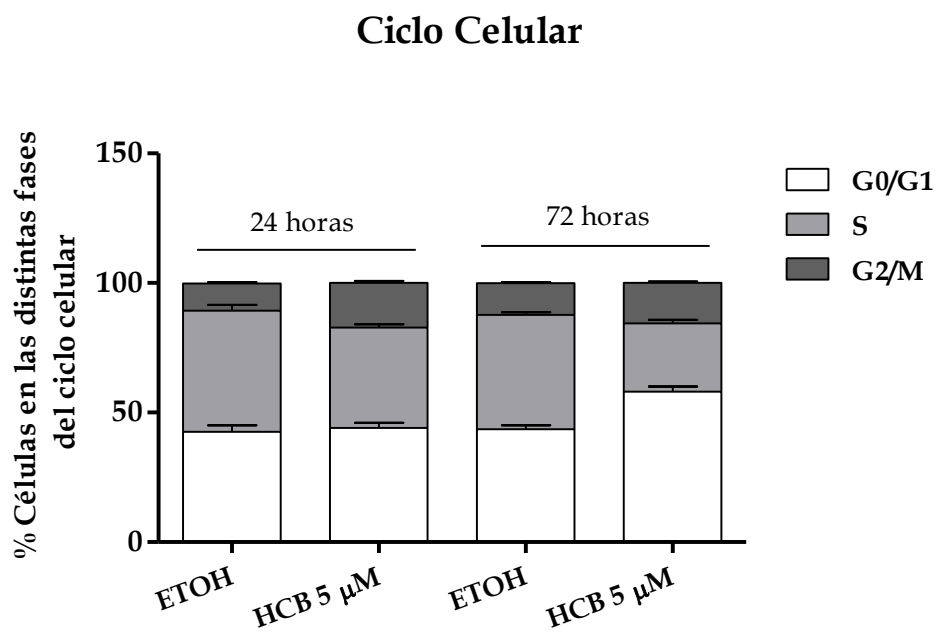


Figura 29: Efecto del HCB en la progresión del ciclo celular en células FRTL-5. Células FRTL-5 fueron tratadas con HCB 5 μM o ETOH durante 24 y 72 horas, luego de una deprivación de nutrientes de 24 horas. Análisis de distribución de células en distintas fases del ciclo celular (G_0 , S y G_2M). Los valores en porcentaje, representan las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes.

DISCUSIÓN



Existen estudios epidemiológicos que, aunque escasos y limitados, sugieren una fuerte asociación entre la contaminación con pesticidas organoclorados y efectos adversos sobre la salud humana. El hecho de tratarse de compuestos biocidas, les confiere a priori una potencial toxicidad.

El HCB es un contaminante ambiental persistente, del tipo pesticida organoclorado, que produce efectos nocivos en el sistema endocrino, en particular sobre la función tiroidea, tanto en animales de experimentación como en humanos. Es considerado un tóxico tipo dioxina, dado que muchos de los efectos que produce, son similares a los producidos por el TCDD (Li et al., 1989), y por su capacidad de unirse, aunque de manera débil, al AhR (Hahn et al., 1989).

En base a los antecedentes de la literatura y a nuestros resultados previos, nos propusimos como objetivo general, investigar las bases bioquímicas y moleculares del mecanismo de acción del HCB sobre la regulación del crecimiento celular tiroideo.

Las alteraciones en la histopatología de la glándula tiroidea, junto con los niveles séricos de hormonas tiroideas, son parámetros que permiten identificar alteraciones funcionales producidas por tóxicos tiroideos administrados a animales de experimentación. Trabajos previos de nuestro laboratorio, demostraron que el tratamiento de ratas con HCB (1000 mg/kg p.c.) producía una disminución del 80% en los niveles circulantes de T₄ total y un aumento en la concentración sérica de TSH, sin alterar el peso tiroideo (Kleiman de Pisarev et al., 1989). Estos datos sugerían la existencia de algún mecanismo inhibitorio del crecimiento tiroideo, o pro-apoptótico desencadenado por el HCB.

En este trabajo hemos demostrado que en ratas tratadas con HCB (500 mg/kg p.c.) se altera la homeostasis de las hormonas tiroideas, produciendo una significativa hipotiroxinemia sin un aumento compensatorio de los niveles séricos de TSH, ni del peso tiroideo. Esta misma dosis de HCB, produjo un significativo aumento en el índice hepatosomático (resultado no mostrado), como ya fue reportado previamente en nuestro y otros laboratorios (Rozman et al., 1986; Kleiman de Pisarev et al., 1990). De modo similar, se ha reportado que otros compuestos organoclorados de la familia de los PCBs, como el Aroclor 1254, producen una disminución del 90% en las concentraciones séricas totales y libres de T₄ sin inducir un aumento en los niveles séricos de TSH (Hood et al., 1999a). Estudios en función del tiempo de intoxicación nos permitirían aclarar si los niveles de TSH podrían haber aumentado transitoriamente a tiempos más cortos de intoxicación, como se ha reportado en ratas tratadas con pregnenolona-16 α -Carbonitrilo (PCN) y PCB (Vansell et al., 2004). Está bien documentado que aumentos en el índice de conversión de T₄ a T₃ en la hipófisis por la enzima deiodinasa tipo II, producen una inhibición de la liberación de TSH, y que por el contrario, la liberación de TSH es estimulada por una disminución en dicho índice de conversión. Es posible que la actividad de la deiodinasa

tipo II fuera regulada en alta en la hipófisis, en respuesta a la hipotiroxinemia inducida por el tratamiento con HCB (500 mg/kg p.c.).

Es interesante señalar que la concentración sérica de HCB en las ratas tratadas con la mayor dosis del tóxico, se encuentra dentro del rango de concentraciones séricas (1,1 - 953 ng/ml), determinadas en un estudio realizado en 100 individuos de una población altamente expuesta al tóxico (To-Figueras et al., 1997), lo que pone de relevancia nuestro modelo experimental.

Las medidas histomorfométricas pueden ser útiles en la caracterización de respuestas tempranas y/o transitorias a tóxicos que tienen múltiples efectos endocrinos (den Tonkelaar y van Esch, 1974). El aumento del área coloidal y la disminución de la altura del epitelio folicular, evidenciado en los cortes histológicos de tiroides de ratas tratadas con HCB 500 mg/kg p.c., sugieren una hipofuncionalidad de la glándula. Estas alteraciones se podrían correlacionar con la disminución observada en los niveles circulantes de T_4 , para esta misma dosis.

Para abordar el estudio específico del efecto del HCB sobre la regulación del crecimiento de la glándula tiroides, trabajamos con dosis menores a 500 mg/kg p.c., para independizarnos de cualquier alteración debida a la disrupción en la economía tiroidea y centrarnos en los efectos moleculares del HCB *per se*, que podrían intervenir en el control del crecimiento celular.

Se ha demostrado que el HCB es un inductor de enzimas microsomales hepáticas (van Raaij et al., 1993b; Visser et al., 1993; Alvarez et al., 2004). Los inductores de UDPGTs que no aumentan la TSH tampoco incrementan consistentemente o apreciablemente la proliferación celular o el número de células tiroideas (Klaassen y Hood, 2001). En nuestro trabajo demostramos que ninguna de las dosis de HCB (0,1 - 100 mg/kg p.c.) causó aumentos en la proliferación celular en tiroides de rata. Estos resultados son compatibles con los niveles normales de TSH sérica, encontrados a las mismas concentraciones. Al respecto es relevante mencionar que el efecto de otros citotóxicos sobre la proliferación celular tiroidea puede ser de una vida media relativamente corta (Hood et al., 1999a), por lo cual estudios en función del tiempo de tratamiento podrían ampliar la información en este sentido. Es interesante señalar que, ensayos preliminares de nuestro laboratorio, demostraron que el co-tratamiento con el agente bociogénico MMI (50 mg/ml) y HCB 10 mg/kg p.c. durante 30 días, induce una disminución en la proliferación celular respecto al tratamiento con MMI sólo, sugiriendo un posible efecto inhibitorio del HCB sobre la misma (resultados no mostrados).

Ciertos compuestos inductores de enzimas microsomales hepáticas aumentan la expresión de TGF- β 1 en tiroides de rata (Kolaja et al., 1999). El TGF- β 1, es el prototipo de una gran familia de citoquinas, sintetizado en las células foliculares tiroideas normales, que juega un rol fisiológico en el control del crecimiento de la glándula tiroides (Carneiro et al., 1998). Es un

potente inhibidor del ciclo celular y de las funciones diferenciadas tiroideas, tales como la captación de iodo y la biosíntesis hormonal. También puede estimular la apoptosis en numerosas líneas celulares tales como folículos tiroideos porcinos (Froschl et al., 1994; Bechtner et al., 1999; Chen et al., 2002) y células epiteliales hepáticas (Teramoto et al., 1998). Sin embargo, la capacidad de inducir muerte celular depende del contexto, estando restringida a cierto tipo de células, a su estado de diferenciación, y sobre todo a la presencia o ausencia de otros factores de crecimiento (Schuster y Krieglestein, 2002). Los procesos de muerte y de proliferación celular deben estar homeostáticamente balanceados no sólo para generar y mantener la compleja arquitectura tisular, sino para adaptarse a situaciones cambiantes como sería el estrés celular inducido por citotóxicos.

En este trabajo hemos demostrado por primera vez, que el HCB aumenta la expresión de TGF- β 1 en tiroides de rata. Este aumento se acompaña con un aumento en el número de células apoptóticas, sugiriendo que esta citoquina podría ser responsable de la inducción de apoptosis en nuestro sistema experimental. Sin embargo nuestros resultados en células FRTL-5, demuestran que el TGF- β 1, no es un mediador de la pérdida de la viabilidad celular por la vía de los SMAD, en esta línea celular. La presencia de apoptosis se ha demostrado durante las etapas tempranas de la formación e involución del bocio (Tamura et al., 1998), así como en varias enfermedades proliferativas tiroideas (Okayasu et al., 1995). Altos niveles de expresión de TGF- β 1, se han visto asociados a mecanismos contra-regulatorios para prevenir el crecimiento tumoral (Derwahl y Studer, 2002). Con respecto a esto, se ha reportado que líneas celulares humanas de carcinoma medular tiroideo tratadas con TGF- β 1, responden disminuyendo la proliferación celular y aumentando el índice de muerte celular (Khosla et al., 1994).

Se ha demostrado que el HCB induce adenomas alveolares tiroideos en Hamster dorados machos (Cabral y Shubik, 1986). Los resultados del presente trabajo pueden ser relevantes para entender los eventos moleculares involucrados en el efecto carcinogénico del HCB en tiroides, debido a que está reportado que el TGF- β 1 puede convertirse en estimulador de la proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis de células transformadas (Stover et al., 2007). Asimismo, se ha propuesto que la inducción en la expresión de TGF- β 1, puede contribuir a la proliferación exagerada de ciertos tirocitos pre-neoplásicos, los cuales son resistentes a la muerte inducida por TGF- β 1 (Kolaja et al., 1999). De todas formas si bien nuestros resultados están lejos de establecer una correlación directa entre la inducción de apoptosis por el HCB y las enfermedades humanas proliferativas tiroideas, proveen antecedentes para futura investigación en esta área.

En relación al mecanismo involucrado en la inducción de apoptosis, nuestros resultados demostraron que el HCB (10 y 100 mg/kg p.c.) induce la liberación del citocromo *c*, de la

mitocondria hacia el citosol, y la activación de la caspasa-9, responsable de la activación de caspasas efectoras que clivan sustratos específicos asociados a las características bioquímicas y morfológicas de las células apoptóticas (Cain, 2003). Estos resultados demuestran que la vía mitocondrial se encuentra involucrada en el efecto apoptótico inducido por el HCB en tiroides de rata. Es interesante, que la activación de caspasas ejecutoras, con la caspasa-9 como iniciadora, es la vía mayormente activada en la apoptosis inducida por numerosos químicos (Sun et al., 1999).

Trabajos de Almeida et al., (1997) y Ezendam et al., (2004) demostraron que el HCB genera estrés oxidativo. Los ROS pueden causar daño tisular, llevando a deficiencias en la función celular, alteraciones en las propiedades físico-químicas de las membranas celulares, una marcada disminución de la actividad enzimática, y muerte celular por apoptosis (Dizdaroglu et al., 2002). Nuestros resultados *in vivo*, muestran un aumento de la expresión de la enzima antioxidante catalasa, lo que sugiere que el HCB altera el balance oxidativo celular, aumentando la generación de ROS, lo que induciría los mecanismos antioxidantes en pos de evitar el daño celular. A su vez, dicho desbalance en la producción de ROS, podría ser el responsable del incremento de citocromo *c* en el citosol, y la activación de la caspasa-9 como demostraron Wang et al., (2008).

La familia de proteínas de Bcl.2, que incluye proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Bcl-xs y proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1 entre otras, se encuentra involucrada en el proceso de apoptosis mitocondrial (Jürgensmeier et al., 1998). Estudios preliminares de nuestro laboratorio realizados en ratas, indican que el HCB induce una desregulación de los niveles de Bax y Bcl-2 mitocondriales, a favor del proceso apoptótico (resultado no mostrados).

La caspasa-8 puede ser activada en respuesta a la activación de numerosos receptores de muerte por unión con sus ligandos específicos incluyendo, TNF, FasL, o en ausencia de señales provenientes de receptores como es el caso de la apoptosis inducida por drogas (Wesselborg et al., 1999). Pese a que nuestros resultados demuestran que la caspasa-8 no es activada durante la inducción apoptótica del HCB en la glándula tiroides de rata, no podemos excluir la participación de la vía de receptores de muerte que podría llevar a la activación final de la caspasa-3, inducida por la caspasa-10.

En resumen, los resultados *in vivo*, han demostrado que el HCB, en dosis que no incrementan los niveles de TSH, aumenta la producción de TGF- β 1 y la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Estos datos contribuyen a considerar a este pesticida como un tóxico tiroideo.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción por el cual el HCB es capaz de inducir apoptosis en células foliculares tiroideas, se utilizó la línea celular FRTL-5. Dichas células, constituyen un buen modelo para investigar el mecanismo de acción del HCB sobre la regulación del crecimiento celular, debido a sus características de células tiroideas normales. Las células FRTL-5, presentan un crecimiento dependiente de TSH, sintetizan TG, forman estructuras de tipo folicular y no son tumorigénicas (Ambesi-Impiombato y Coon, 1979). Del mismo modo que en tiroides de rata, el crecimiento de estas células puede ser inhibido por TGF- β 1 (Pang et al., 1992). En nuestro modelo *in vitro*, empleamos dosis de HCB utilizadas previamente en nuestro laboratorio en incubaciones con células de tumores mamarios, en las que el HCB inducía la proliferación celular (García et al., 2010) y cubren el rango de dosis encontradas en suero de humanos altamente expuestos al HCB (To-Figueras et al., 1997).

De manera similar a lo observado en el modelo *in vivo*, el HCB induce la expresión del gen de TGF- β 1 en las células FRTL-5. Numerosos estudios han demostrado que el TGF- β 1 es capaz de inducir en células foliculares tiroideas, no sólo apoptosis e inhibición del crecimiento celular, sino también la inhibición de numerosos parámetros funcionales que incluyen, la captación de yodo, la secreción hormonal, la expresión del gen de la TG, del simporter Na⁺/I⁻, y de la peroxidasa tiroidea, entre otros parámetros (Pisarev et al., 2009). Hemos demostrado en este trabajo, que el tratamiento con HCB induce una disminución en los niveles de TG, sugiriendo la alteración de parámetros funcionales. Son necesarios estudios complementarios para aclarar si los aumentos en los niveles de TGF- β 1, están asociados a la disminución de este parámetro funcional.

Nuestros resultados en células FRTL-5, mostraron que el HCB no induce alteraciones en la proliferación celular, evaluada mediante la determinación de los niveles de la proteína PCNA, una proteína nuclear sintetizada en la fase G₁ temprana y S del ciclo celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN, debido a que se trata de un cofactor de la ADN polimerasa δ . Cuando existen daños en el ADN, causados por radicales libres endógenos, o agentes ambientales, la proteína PCNA, participa en la vía de tolerancia al daño (Acharya et al., 2008). Las células eucariotas poseen numerosos mecanismos para proteger la integridad del ADN contra posibles daños. Estos mecanismos incluyen los puntos de control del ciclo celular, las vías de reparación del ADN y también distintos sistemas de tolerancia al daño. En general los estudios sobre la genotoxicidad del HCB, indican que carece o tiene un débil efecto genotóxico (Górski et al., 1986, IPCS, 1997). Aunque demostramos que el HCB no induce alteraciones en los niveles de PCNA en células FRTL-5, serían necesarios estudios sobre los mecanismos de reparación y evasión del daño en el ADN, para determinar el efecto del HCB sobre la estructura de esta molécula, en este modelo experimental.

Nuestros resultados demostraron que el HCB 0,5 y 5 μM , induce la pérdida de viabilidad en células FRTL-5. Incubaciones realizadas en presencia de un inhibidor específico del T β RI, SB431542, demostraron que la disminución en el porcentaje de sobrevivida celular inducida por el pesticida, es independiente de la activación de la vía de señalización de TGF- β 1 por proteínas SMAD.

Al poseer, el HCB, la capacidad de unirse de manera débil al AhR, es posible que algunos de sus efectos sean mediados a través de este receptor. Numerosos trabajos han reportado que el AhR activa diferentes vías de señales de transducción, de manera paralela a la activación de las vías de detoxificación, y muchas veces, hasta en ausencia de estimulación por ligandos exógenos (Marlowe y Puga, 2005). En el presente estudio, demostramos que el HCB induce la pérdida de viabilidad en las células FRTL-5, independientemente de su unión al AhR, ya que el co-tratamiento con un antagonista del receptor, como la 4,7 PHE, no previene dicho efecto. Contrariamente, otros trabajos realizados, tanto *in vivo* como *in vitro* en ovario de ratón en estadios fetales, demostraron que la exposición a distintos PAH producen un aumento de la apoptosis de células germinales, en forma dependiente del AhR (Matikainen et al., 2002).

La pérdida de viabilidad celular, puede deberse a numerosos mecanismos, entre ellos a un aumento en la muerte celular ya sea por apoptosis, necrosis, o por inhibición del crecimiento, debido a un arresto del ciclo celular. Las células tratadas con HCB 0,5 y 5 μM , presentaban alteraciones en la morfología nuclear típicas de células apoptóticas, presencia de fragmentos de ADN clivados (TUNEL), y activación de la caspasa-3, caspasa ejecutora crucial en el proceso apoptótico, demostrando que la pérdida en la viabilidad celular inducida por el tóxico, está asociada, por lo menos en parte, a un aumento en la apoptosis celular.

Para evaluar las vías involucradas en la inducción de apoptosis en las células FRTL-5, se analizó la activación de la caspasa-8 y 10 como representantes de la activación de las vías de receptores de muerte y la liberación de AIF y citocromo *c* desde la mitocondria, como marcadores de la activación de la vía mitocondrial. La activación tanto de la caspasa-8 como de la caspasa-10, sugiere que la vía de receptores de muerte, podría estar involucrada en el mecanismo de acción del HCB sobre la inducción de apoptosis *in vitro*. Estos resultados difieren con aquellos observados en los estudios *in vivo*, donde no se observó el procesamiento de la caspasa-8.

El AIF es una enzima NADH oxidasa bifuncional, que se encuentra involucrada en la respiración mitocondrial y en la apoptosis independiente de caspasas. El AIF cumple un rol pro-sobrevida a través de su actividad redox en la mitocondria, pero cuando el potencial mitocondrial se pierde adquiere un rol letal, traslocándose hacia el núcleo, donde causa la condensación parcial de la cromatina y la fragmentación del ADN (Candé et al., 2002). El HCB, a la máxima concentración, induce la liberación del AIF desde la mitocondria hacia el citosol y

su posterior traslocación el núcleo celular. Otro de los factores apoptogénicos liberados durante el tratamiento con HCB es el citocromo *c*. El citocromo *c*, posee, como el AIF, dos funciones biológica principales, a saber, en la respiración celular (Pinheiro et al., 2003), y en la activación de la vía apoptotica mitocondrial (Schug y Gottlieb, 2009). Bajo condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial, sin embargo, algunos estímulos provocan su liberación hacia el citosol, acompañado por la pérdida del potencial de membrana. Nuestros resultados demostraron que el citocromo *c*, sólo fue detectado en citosol a tiempos cortos de exposición (2 horas). En células granulosas del cerebelo, se ha reportado que la activación de la caspasa-3 está estrictamente sincronizada con la liberación del citocromo *c* (Bobba et al., 1999). Estos autores demostraron, que la liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol es un evento temprano, que ocurre a partir de los 30 minutos, con un máximo a las 3 horas, post tratamiento con un inductor de apoptosis. Sin embargo, en fases tardías, de 3 a 15 horas, el contenido citosólico del citocromo *c* disminuye abruptamente, como resultado de su degradación por caspasas. Una vez que los niveles citosólicos de citocromo *c* alcanzan un valor umbral, se inicia la activación de la caspasa-9 (Zou et al., 1997) y posterior activación de la caspasa-3 (Martin y Green, 1995). Estos resultados concuerdan con los del presente trabajo, en cuanto a que la activación de la caspasa-3, no es detectable a las 2 horas, cuando el citocromo *c* alcanza los niveles máximos en el citosol, y comienza a ser detectable, cuando estos últimos caen abruptamente.

En resumen, en conjunto nuestro resultados demuestran por primera vez, que la apoptosis inducida por el HCB en células FRTL-5, es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición al mismo, e involucra la activación de caspasas iniciadoras de la vía de receptores de muerte, y la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria hacia el citosol, activando también, vías apoptóticas independientes de la activación de caspasas.

Está bien documentado que la disfunción mitocondrial es característica en la apoptosis (Lemasters et al., 2002). La mitocondria es una organela altamente dinámica que continuamente se fusiona y fisiona, modificando su morfología desde un complejo entramado a pequeños granos esféricos, de acuerdo a los requerimientos celulares. Existe una conexión recíproca entre la dinámica mitocondrial y la apoptosis (Suen et al., 2008). La apoptosis esta frecuentemente asociada con la fisión mitocondrial y el desplazamiento del equilibrio de la dinámica, entre fisión y fusión, aumenta o disminuye el proceso apoptótico, respectivamente. Hemos demostrado que el tratamiento de células FRTL-5 con HCB, induce la fisión mitocondrial y pérdida del $\Delta\psi_m$.

El daño mitocondrial es consistente con un aumento en la producción intracelular de ROS y cambios en el $\Delta\psi_m$ durante la apoptosis (Kim et al., 2004). Una sobre-producción de ROS

puede resultar en una disfunción mitocondrial, causando una pérdida en el $\Delta\psi_m$, promoviendo la liberación del citocromo *c*, la activación de la caspasa-3, y el desencadenamiento de la apoptosis celular (Orrenius, 2007). El metabolismo de xenobióticos por enzimas de la familia de los citocromo P450, produce aumentos en los niveles endógenos de ROS (Gonzalez et al., 2006), que si no son neutralizados efectivamente por la defensa antioxidante, generan estrés oxidativo. Se ha demostrado que la toxicidad mediada por contaminantes ambientales está asociada a una excesiva producción de ROS, que produce daños en macromoléculas celulares (Itziou et al., 2011). Existe evidencia que sugiere un aumento en el estado oxidativo celular, podría actuar como estímulo inductor de múltiples mecanismos que conducirían a la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis (Kannan y Jain, 2000).

El mecanismo general para la inducción de apoptosis por los xenobióticos involucra un aumento en los niveles de ROS, y la activación de la vía intrínseca de apoptosis (Owuor y Kong, 2002; Li et al., 2003). No obstante, se ha sugerido que ROS actúan como mediadores de la vía extrínseca de apoptosis, estimulando el agrupamiento de receptores de muerte y la formación de una plataforma de señalización derivada de balsas lipídicas (Zang et al., 2006 y 2007).

En este trabajo hemos reportado que los niveles de ROS son incrementados tempranamente (a partir de las 2 horas) en respuesta al tratamiento con HCB (0,5 y 5 μM). Asimismo, demostramos que la apoptosis inducida por el HCB es dependiente de este aumento, dado que la incubación con un compuesto secuestrador de ROS, como el TROLOX, aumentó la supervivencia celular, e inhibió la liberación del AIF de la mitocondria. En forma similar, se han demostrado que el tratamiento de células en cultivo con peróxido de hidrógeno, induce la muerte celular por apoptosis (Liu et al. 1999), y que la adición de antioxidantes como la N-acetilcisteína (NAC), o la sobreexpresión de enzimas antioxidantes intracelulares bloquean de manera completa, o retardan el efecto.

La defensa antioxidante enzimática y no enzimática, son el sistema de protección contra el daño mediado por estrés oxidativo. El tratamiento con HCB disminuye la expresión de la enzima SOD1 a las 6 horas en células FRTL-5. Numerosos trabajos involucran al TGF- β 1 en la supresión de la expresión de genes de enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD1 y SOD2, y como consecuencia de ello, la inducción de aumentos en los niveles de ROS, involucrados en procesos como la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis (Kayanoki et al., 1994). Nosotros sugerimos que la disminución en los niveles de la enzima SOD1, sería una de las causas responsables del aumento de los ROS, por el HCB.

No obstante, la exposición sostenida al HCB induce un aumento en la expresión de la enzima SOD1 y de la catalasa, medido a las 24 horas, que podría ser atribuido a una respuesta homeostática de la célula al aumento intracelular de ROS.

Además, otros mecanismos inductores de un estado pro-oxidante podrían ser disparados por el HCB, tales como la disrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o el producto del metabolismo de los xenobióticos, entre otros.

La importancia de las vías de señalización de las MAPKs en la regulación de la apoptosis durante condiciones de estrés ha sido ampliamente estudiada. Muchos trabajos apoyan la visión general, que la activación de la vía de ERK1/2 induce señales anti-apoptóticas y de supervivencia celular, mientras que la activación de las vías de JNK y p38 presenta un efecto dual, de supervivencia y pro-apoptosis (Guyton et al. 1996; Brenner et al., 1997). La vía de señalización de ERK1/2 está involucrada en múltiples vías de transducción de señales. Está reportado, que la activación de esta MAPK, estimula la proliferación vía la inducción de la expresión de la ciclina D (Cheng et al., 1998), o vía la inactivación del inhibidor del ciclo celular p27^{Kip1} (Lenferink et al., 2001). También, se ha demostrado que ERK1/2 previene la apoptosis por un mecanismo de inhibición de la activación de caspasas (Tran et al., 2001) y la inducción de la expresión de factores anti-apoptóticos, como Mcl-1 (Townsend et al., 1998).

En el presente estudio, demostramos que la activación sostenida de ERK1/2 (hasta 24 horas de exposición) es un evento importante y necesario, en la inducción de apoptosis por el HCB en células FRTL-5, dado que la pérdida de viabilidad celular y la activación de la caspasa-3, no tienen lugar en presencia de un inhibidor específico de la actividad de MEK1, PD98059. Kim et al., (2008), mostraron que el tratamiento con kaempferol, un flavonoide natural, produce la muerte apoptótica de células de cáncer de mama humano MCF-7, a través de un mecanismo que involucra la activación sostenida del ERK1/2 y el aumento en la producción de ROS. Este efecto es revertido por el tratamiento con PD98059 o NAC (compuesto secuestrador de ROS) (Kim et al., 2008). Al respecto nuestros resultados demostraron que la incubación con TROLOX, no sólo inhibe la citotoxicidad inducida por HCB, sino también la activación de ERK1/2, sugiriendo que la activación de esta MAPK se encontraría río abajo de la producción de ROS.

Si bien el hecho de que los ROS activan MAPKs está bien documentado, el mecanismo involucrado aún no se encuentra esclarecido completamente. Existe un modelo aceptado que propone que la activación transiente de ROS inactiva fosfatasa reguladoras de las MAPKs, mediante la interacción con un residuo de cisteína, sensible a redox, en el sitio activo (Denu y Tanner, 1998).

JNK y p38 MAPKs son inducidas en respuesta a citoquinas y a distintos estresores celulares, como los xenobióticos (Namgung y Xia, 2000, Johnson y Lapadat, 2002). Una vez activadas pueden mediar entre otros procesos, diferenciación y muerte celular por apoptosis. Nuestros resultados demostraron que el HCB 5 μ M induce la activación de p38 en forma rápida y transiente. Los ensayos en presencia del inhibidor específico de la p38 MAPK, SB203580, demostraron que el tratamiento con dicho compuesto, inhibió la fosforilación de la misma, sin

restaurar la pérdida de viabilidad celular, sugiriendo que la apoptosis inducida por HCB no está mediada por la p38 MAPK. Se ha propuesto que los compuestos de tipo pirimidazoles, como el SB203580, inhiben la actividad enzimática de p38, a través de su unión a la forma inactiva de la quinasa, resultando en una reducción significativa en la activación de la misma (Frantz et. al., 1998; Aggeli et. al., 2001; Kefaloyianni et. al., 2005).

En relación a la activación de JNK, en este trabajo hemos reportado que el tratamiento con HCB (5 μ M) induce la activación de la JNK a las 6 y 8 horas de tratamiento. Sin embargo la inhibición de esta vía por medio de un inhibidor específico de JNK1/2 y 3, SB600125, no altera la sensibilidad de las células FRTL-5 a la pérdida de viabilidad inducida por el HCB, señalando que estas MAPKs no está involucradas en el mecanismo de acción del HCB sobre la supervivencia celular.

Los dos mecanismos principales en la regulación de la proliferación son la apoptosis y el control del ciclo celular. La progresión del ciclo en células de mamíferos está finamente controlada por la activación secuencial de las CDKs cuyas actividades están reguladas por la unión de sus subunidades regulatorias a la ciclinas o por sus inhibidores (inhibidores de CDKs) (Sherr y Roberts, 1999). La ciclina D1, regula el encendido y entrada en la fase G₁ del ciclo celular, funcionando como sensor mitogénico y activador alostérico de CDK4/6. Su expresión es inducida por factores de crecimiento, los cuales actúan a múltiples niveles, aumentando su transcripción, traducción y su estabilidad (Kim et al., 2009). Por otra parte, la ciclina D1 tiene la capacidad de secuestrar a los inhibidores del ciclo p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, permitiendo una eficiente activación de los complejos que contienen CDK2 (Sherr y Roberts, 1999). La ciclina D1, regula el arresto en la fase G₁ del ciclo celular.

El inhibidor de CDKs, p27, fue inicialmente identificado en células arrestadas por TGF- β 1, por inhibición por contacto o por lovastatina (Koff et al., 1993; Polyak et al., 1994; Hengst et al., 1994; Slingerland et al., 1994). Los niveles de p27 son máximos en células quiescentes, y sus niveles caen abruptamente durante la salida de G₀ y la progresión de G₁ hacia la fase S (Göpfert et al., 2003). Factores mitogénicos causan una pérdida en los niveles de p27, mientras que sus niveles y/o actividad aumentan frente a estímulos como, señales de diferenciación (Durand et al., 1997), pérdida de adhesión a la matriz extracelular (Koyama et al., 1996), o en respuesta a factores inhibitorios del crecimiento, como el TGF- β 1 (Polyak et al., 1994).

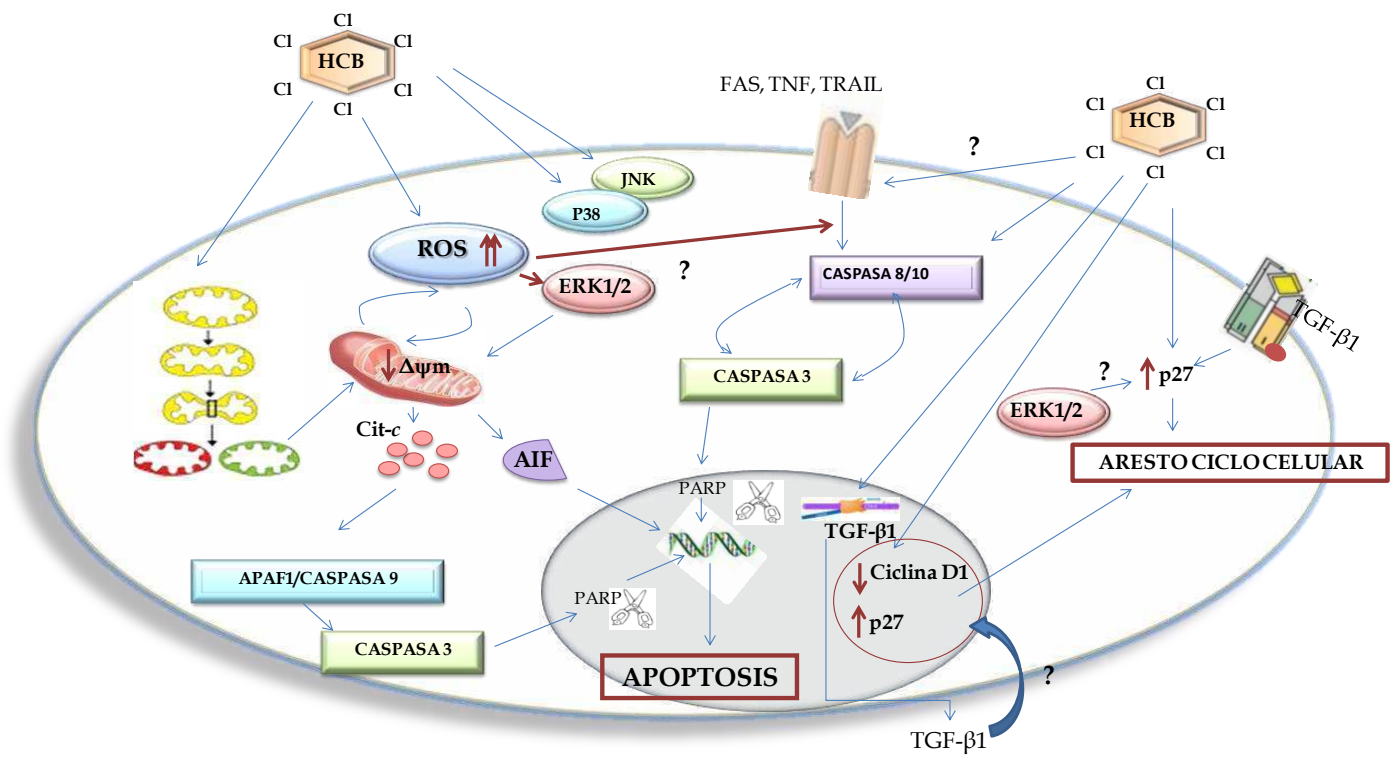
En este trabajo hemos demostrado, que el HCB causa alteraciones en los niveles de proteínas regulatorias del ciclo celular, disminuyendo los niveles nucleares de ciclina D1 e incrementando los niveles, citosólicos y nucleares de p27. Es interesante señalar que una sostenida estimulación de ERK1/2, no sólo induce la apoptosis, sino que también inhibe el ciclo celular a través de la inducción de la expresión de proteínas inhibitoras del ciclo como p21^{Cip/Waf} y p27^{Kip1} (Marshall, 1999).

Finalmente, con el objetivo de determinar una posible correlación entre los desbalances hallados en proteínas regulatorias del ciclo celular, y un arresto en alguna de sus fases, se realizó un análisis de la distribución de células en las distintas fases del mismo. Demostramos que el HCB induce un arresto inicial de células en G₂/M (24 horas), y un posterior arresto en G₁ (72 horas). Como los tratamientos fueron realizados en medio completo, es decir suplementado con SFB y todas las hormonas necesarias para permitir la proliferación de las células FRTL-5, éstas pueden iniciar su paso a través del ciclo, aún en presencia del tóxico, quedando arrestadas en fases posteriores (G₂/M). A medida que aumenta el tiempo de exposición al HCB, comienza a verse un aumento de células en fase G₁, sugiriendo que el HCB podría estar actuando a distintas etapas del ciclo celular. Se ha demostrado que los ROS están involucrados en inducir arresto del ciclo celular en G₂/M, a través de la fosforilación, y subsecuente degradación, de la fosfatasa inductora de la fase-M, cdc25C (Xiao et al., 2005), la que produce la desfosforilación de la CDK1, disparando la entrada de las células en mitosis. Trabajos posteriores, ayudarán a esclarecer el mecanismo de acción involucrado en la inhibición del ciclo celular inducida por el HCB.

En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez, que el HCB induce un desbalance en la homeostasis del crecimiento celular tiroideo, alterando la apoptosis y la progresión del ciclo celular. La inducción de apoptosis involucra la activación de caspasas de la vía de receptores de muerte, la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. El aumento en la apoptosis está mediado por ROS y por la activación de ERK1/2.

Estos resultados cobran especial importancia, dado que la tiroides es un órgano fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, óseo y neuromuscular, en etapas tempranas de su formación, que podrían verse afectados por la exposición al HCB. Por otro lado el desbalance entre la proliferación y la apoptosis, ha sido involucrado en la progresión del cáncer en múltiples tejidos.

MODELO PROPUESTO



BIBLIOGRAFÍA



- Acharya N, Yoon JH, Gali H, Unk I, Haracska L, Johnson RE, Hurwitz J, Prakash L. **Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase ϵ in translesion DNA synthesis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(46):17724-9.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1996). **Toxicological profile for Hexachlorobenzene.** Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2002). **Toxicological Profile for Hexachlorobenzene.** U.S.D.O.H.A.H., Services, Atlanta, GA.
- Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis. **Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart.** I.Mol Cell Biochem. 2001; 221(1-2):63-9.
- Almeida MG, Fanini F, Davino SC, Aznar AE, Koch OR, Barros SB. **Pro- and anti-oxidant parameters in rat liver after short-term exposure to hexachlorobenzene.** Hum Exp Toxicol. 1997; (5):257-61.
- Alvarez L, Burgueño A, Zeni S, Randi AS, Hernández S, Hockl P, Pisarev MA, Kleiman de Pisarev DL. **Comparison of the effects of 3,5,3'-triiodothyroacetic Acid and triiodothyronine on goiter prevention and involution and on hepatic and skeletal parameters in rats.** Horm Metab Res. 2004; 36(5):291-7.
- Alvarez L, Hernández S, Martínez-de-Mena R, Kolliker-Frers R, Obregón MJ, Kleiman de Pisarev DL. **The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status.** Toxicology. 2005; 207(3):349-62
- Alvarez L, Randi A, Alvarez P, Piroli G, Chamson-Reig A, Lux-Lantos V, Kleiman de Pisarev DL. **Reproductive effects of hexachlorobenzene in female rats.** J Appl Toxicol. 2000; 20, 81-7.
- Ambesi-Impiombato FS, Coon HG. **Thyroid cells in culture.** Int Rev Cytol Suppl. 1979; (10):163-72. Review.
- Ambesi-Impiombato FS, Villone G. **The FRTL-5 thyroid cell strain as a model for studies on thyroid cell growth.** Acta Endocrinol Suppl (Copenh). 1987; 281:242-245.
- Amstad P, Moret R, Cerutti P. **Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress.** J Biol Chem. 1994 ; 269(3):1606-9.
- Basu A, Haldar S. **Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis.** FEBS Lett. 2003; 538(1-3):41-7.
- Bechtner G, Froschl H, Sachse A, Schopohl D, Gartner R. **Induction of apoptosis in porcine thyroid follicles by transforming growth factor beta1 and epidermal growth factor.** Biochimie. 1999; 81(4):315-20.
- Behrends J, Clément S, Pajak B, Pohl V, Maenhaut C, Dumont JE, Schurmans S. **Normal Thyroid Structure and Function in Rhoophilin 2-Deficient Mice.** Mol cell Biol. 2005; 25(7): 2846-2852.
- Berlett BS, Stadtman ER. **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.** J Biol Chem. 1997; 272, 20313-20316.
- Bierie B, Moses HL. **Tumor microenvironment: TGF- β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer.** Nat Rev Cancer. 2006; 6:506-520.
- Bobba A, Atlante A, Giannattasio S, Sgaramella G, Calissano P, Marra E. **Early release and subsequent caspase-mediated degradation of cytochrome c in apoptotic cerebellar granule cells.** FEBS Lett. 1999; 457(1):126-30.

- Boise LH, González-García M, Postema CE. **Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.** Cell. 1993; 74:597-08.
- Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB. **Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation.** Curr Top Microbiol Immunol. 1995; 200:107-21.
- Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. **Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging.** Curr Opin Cell Biol. 2003; 15:706-716.
- Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem. 1976; 72:248-254.
- Brenner B, Koppenhoefer U, Weinstock C, Linderkamp O, Lang F, Gulbins E. **Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153.** J Biol Chem. 1997; 272(35):22173-81.
- Cabral JR, Shubik P. **Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in mice and hamsters.** IARC Sci Publ 1986; (77):411-6.
- Cai B, Chang SH, Becker EBE, Bonni A, and Xia Z. **p38 MAP Kinase Mediates Apoptosis through Phosphorylation of BimEL at Ser-65.** J Biol Chem. 2006 281,35,25215-25222.
- Cai J, Yang J. **Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c.** Biochim Biophys Acta. 1998; 1366(1-2): 139-49.
- Cain K. **Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome.** Drug Metab Rev. 2003; 35(4):337-63. Review.
- Camacho IA, Singh N, Hegde VL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. **Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF- κ B and expression of Fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in T cells.** J Immunol. 2005; 1; 175(1):90-103.
- Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. **Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria.** Biochimie. 2002; 84:215-222.
- Carneiro C, Alvarez CV, Zalvide J, Vidal A, Domínguez F. **TGF-beta1 actions on FRTL-5 cells provide a model for the physiological regulation of thyroid growth.** Oncogene. 1998; 16(11):1455-65.
- Chen SY, Lu FJ, Gau RJ, Yang ML, Huang TS. **15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis of a thyroid papillary cancer cell line (CG3 cells) through increasing intracellular iron and oxidative stress.** Anticancer Drugs. 2002; 13:759-65.
- Chen T, Wong YS. **Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation.** Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008; 41:666-676.
- Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF. **Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1).** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 3;95(3):1091-6.
- Chiappini F. **Efecto de pesticidas organoclorados en la regulación del crecimiento de la glándula tiroidea.** Tesis de Licenciatura. 2007.
- Chomczynski, P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** Anal.Biochem 1987; 162:156-159.
- CHRIS, United States Coast Guard. **Hexachlorobenzene, in Chemical Hazard Response Information System (CHRIS),** CD-ROM. 1994; vol 20, Micromedex Inc, Denver, CO, USA).
- Cirafici AM, Pepe S, Mincione G, Esposito D, Colletta G. **TGF- β inhibits rat thyroid cells proliferation without alteration in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes.** Biochem Biophys Res Commun. 1992; 187,225-233.

- Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. **Requirements of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle.** *Science*. 1996; 272: 877-880.
- Cohen PS, Schmidtmyerova H. **The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication.** *Mol Med*. 1997; 3(5): 339-46.
- Colleta G, Cirafici AM, Di Carlo A. **Dual effect of transforming growth factor β on rat thyroid cells: inhibition of thyrotropin-induced proliferation and reduction of thyroid-specific differentiation markers.** *Cancer Res*. 1989; 49:3457-3462
- Coppa A, Mincione G, Lazzereschi D, Ranieri A, Turco A, Lucignano B, Scarpa S, Ragano-Caracciolo M, Colletta G. **Restored expression of transforming growth factor β type II receptor in K-ras-transformed thyroid cells, TGF- β resistant, reverts their malignant phenotype.** *J Cell Physiol*. 1997; 172:200-208.
- Coppa A, Mincione G, Mammarella S, Ranieri A, Colletta G. **Epithelial rat thyroid cell clones, escaping from transforming growth factor beta negative growth control, are still inhibited by this factor in the ability to trap iodide.** *Cell Growth Differ*. 1995; 6:281-290.
- Courtney KD. **Hexachlorobenzene (HCB): A review.** *Environ Res* 1979; 20:225-266.
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. **Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.** *J Cell Mol Med*. 2006; 10, 389-406.
- den Besten C, Bennik MH, Bruggeman I. **The role of oxidative metabolism in hexachlorobenzene- induced porphyria and thyroid hormone homeostasis: A comparison with pentachlorobenzene in a 13-week feeding study.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 119:181-194.
- den Tonkelaar EM, van Esch GJ. **No-effect levels of organochlorine pesticides based on induction of microsomal liver enzymes in short-term toxicity experiments.** *Toxicology*. 1974; 2: 371-380.
- Denu JM, Tanner KG. **Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation.** *Biochemistry*. 1998; 37(16):5633-42.
- Der Parsehian S, Grandi C. **Medio ambiente y Salud Materno-Infantil: Contaminantes Organoclorados en Leche Humana** (Texto del Resumen Oficial del Congreso) 33er Congreso Argentino de Pediatría (Libro de resúmenes RP 136, Mar del Plata, 1 al 4 de Octubre del 2003).
- Derwahl M, Studer H. **Hyperplasia versus adenoma in endocrine tissues: are they different?** *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13(1):23-8.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. **TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression.** *Nat. Genet*. 2001; 29:117-129.
- Derynck R, Zhang YE **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.** *Nature*. 2003; 425(6958):577-84.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. **Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement.** *Endocr Rev*. 2009; 30(4):293-342.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. **Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement.** *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:1102-15.
- Dreiem A, Rykken S, Lehmler HJ, Robertson LW, Fonnum F. **Hydroxylated polychlorinated biphenyls increase reactive oxygen species formation and induce cell death in cultured cerebellar granule cells.** *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Oct 15;240(2):306-13.

- Duband-Goulet D, Courvalin JC, Buendia B. **LBR, a laminin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis.** *J Cell Sci* 1998; 111: 1441-1451.
- Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP. **Growth factors controlling the thyroid gland.** In: Robertson DM, Herington AC (eds) *Clinical endocrinology and metabolism*, vol 5/4. Baillière Tindall, London, 1991; pp 727-754.
- Durand B, Gao FB, Raff M. **Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation.** *EMBO J.* 1997; 16:306-317.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7:663.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. **Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.** *Free Radic Biol Med.* 1991; 11, 81-128
- Ezendam J, Hassing I, Bleumink R, Vos JG, Pieters R. **Hexachlorobenzene-induced Immunopathology in Brown Norway rats is partly mediated by T cells.** *Toxicol. Sci.* 2004; 78, 88-95.
- Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. **Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling.** *Biochimie.* 2002; 84, 131-141
- Foster WG, Mertineit C, Yagminas A, McMahon A, Lecavalier P. **The effects of hexachlorobenzene on circulating levels of adrenal steroids in the ovariectomized rat.** *J Biochem Toxicol.* 1995; 10(3):129-35.
- Foster WG, Pentick JA, Mc Mahon A, Lecavalier PR. **Ovarian toxicity of hexachlorobenzene (HCB) in the superovulated female rat.** *J. Biochem. Toxicol.* 1992; 7, 1-4.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. **The role of dynamin related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis.** *Dev Cell.* 2001; 1: 515-525.
- Frantz B, Klatt T, Pang M, Parsons J, Rolando A, Williams H, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA. **The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding.** *Biochemistry.* 1998; 37(39):13846-53.
- Franzen A, Piek E, Westermark B, ten Dijke P, Heldin NE. **Expression of transforming growth factor- β 1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function.** *Endocrinology.* 1999; 140:4300-4310
- Froschl H, Rafferzeder M, Erlinger R, Gartner R. **Identification of apoptosis in porcine thyroid follicular cells in vitro.** *J Endocrinol. Invest.* 1994; (Suppl. 17), 54.
- Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. **Reactive oxygen species: a breath of life or death?** *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3):789-94.
- García MA, Peña D, Alvarez L, Cocca C, Pontillo C, Bergoc R, de Pisarev DK, Randi A **Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor alpha-dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line.** *Toxicol Lett.* 2010; 192(2):195-205.
- Garrido C, Galluzzi L. **Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.** *Cell Death Differ.* 2006; 13(9): 1423-33.
- Garrington TP, Johnson GL. **Organization and regulation of mitogenactivated protein kinase signaling pathways.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11: 211-218.
- Gärtner R. **Thyroid growth in Vitro.** *Exp Clin Endocrinol* 1992; 100: 32-35.
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. **Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signal?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8, 722-728.

- Gocmen A, Peters HA, Cripps DJ, Bryan GT, Morris CR. **Hexachlorobenzene episode in Turkey**. *Biomed Environ Sci*. 1989; 2(1):36-43.
- Gonzalez FJ, Tukey RH. Drug metabolism. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editor. *Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*. 11. New York: McGraw Hill; 2006; 71-91.
- Göpfert U, Kullmann M, Hengst L. **Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF**. *Hum Mol Genet*. 2003; 12(14):1767-79.
- Górski T, Górski E, Górecka D, Sikora M. **Hexachlorobenzene is non-genotoxic in short-term tests**. *IARC Sci Publ*. 1986; (77):399-401.
- Green DR, Kroemer G. **The pathophysiology of mitochondrial cell death**. *Science*. 2004; 30; 305(5684):626-9.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. **Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling**. *Cardiovasc Res*. 2000; 91: 21-27.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. **The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:519-561.
- Gustafson DL, Long ME, Thomas RS, Benjamin SA, Yang RS. **Comparative hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene: application of a medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices**. *Toxicol Sci*. 2000; 53, 245-252.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. **Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury**. *J Biol Chem*. 1996; 271(8):4138-42.
- Hacker G. **The morphology of apoptosis**. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 5-17.
- Hahn ME, Goldstein JA, Linko P. **Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo**. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 270(1):344-355.
- Halliwell B, Chirico S. **Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance**. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.
- Hankinson O. **The aryl hydrocarbon receptor complex**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995; 35:307-340.
- Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. **A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 ; 91(12):5291-5.
- Hood, A, Hashmi R, Klaassen CD. **Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid-follicular cell proliferation, hyperplasia, and hypertrophy**. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1999a; 160, 163-170.
- Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. **The machines that divide and fuse mitochondria**. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76:751-80. Review.
- Hotchkiss, J.H. **Pesticide residue controls to ensure food safety**. *Critical Rev. Food Sci.Nutrition*. 1992; 31:191-203.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. **Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 4386-4391.
- Iavarone A, Massagué J. **Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15**. *Nature*. 1997; 387(6631):417-22.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1997). **Hexachlorobenzene. Environmental Health Criteria, 195**. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.

- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, Nakayama K. **Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability.** J. Biol. Chem. 2000; 275: 25146-25154.
- Itziou A, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. **Effects of organic contaminants in reactive oxygen species, protein carbonylation and DNA damage on digestive gland and haemolymph of land snails.** Chemosphere. 2011; 85(6):1101-7.
- Jabs T. **Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals.** Biochem Pharmacol. 1999; 57(3):231-45. Review.
- Jacobson MD, Raff MC. **Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen.** Nature. 1995; 374: 814-816.
- Jing X, Ueki N, Cheng J, Imanishi H, Hada T. **Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin.** Jpn J Cancer Res. 2002; 93:874-82.
- Jing LIU, Anning LIN. **Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword.** Cell Research. 2005; 15, 36-42.
- Johnson GL, Lapadat R. **Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.** Science. 2002; 298:1911-1912.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. **Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(9):4997-5002.
- Kamata H, Hirata H. **Redox regulation of cellular signalling.** Cell Signal. 1999; 11(1): 1-14.
- Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A. **Molecular Mimicry of Human Cytochrome P450 by Hepatitis C Virus at the Level of Cytotoxic T Cell Recognition.** J Exp Med. 1999; 190:169-176. doi: 10.1084/jem.190.2.169.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. **Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase.** Nat. Cell Biol. 2004; 6: 1229-1235.
- Kannan K, Jain SK. **Oxidative stress and apoptosis.** Pathophysiology. 2000; Sep;7(3):153-163.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. **Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.** Cancer Res. 1993; 57: 3976-3985.
- Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. **Transforming growth factor-β1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻ symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells.** Thyroid. 1997; 7:789-794
- Kayanoki Y, Fujii J, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. **Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor-beta 1 in rat hepatocytes.** J Biol Chem. 1994; 269(22):15488-92
- Kefaloyianni E, Gourgou E, Ferle V, Kotsakis E, Gaitanaki C, Beis I. **Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or antiapoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.).** The Journal of Experimental Biology. 2005; 208, 4427-4436.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer. 1972; 26(4):239-57.
- Khan QA, Dipple A. **Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells.** Carcinogenesis. 2000; 21(8):1611-1618.

- Khosla S, Oursler M, Schroeder M, Eberhardt N. **Transforming growth factor induces growth inhibition of human medullary carcinoma cell line despite an increase in steady-state c-myc messenger ribonucleic acid levels.** *Endocrinology*. 1994; 135: 1887-1893.
- Kim BW, Lee ER, Min HM, Jeong HS, Ahn JY, Kim JH, Choi HY, Choi H, Kim EY, Park SP, Cho SG. **Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition.** *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(7):1080-9.
- Kim JK, Diehl JA. **Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer.** *J Cell Physiol*. 2009; 220(2):292-6.
- Kim WH, Park WB, Gao B, Jung MH. **Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells.** *Mol Pharmacol*. 2004; 66(6):1383-96.
- Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, and Kim JM. **Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells.** *J Appl Toxicol*. 2005; 25:374-382.
- Kim YT, Zhao M. **Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma.** *Yonsei Medical Journal*. 2005; 46:597-613.
- Kim, BW; Lee, ER; Min, HM, Jeong, HS; Ahn, JY; Kim, JH; Choi, HY; Choi, H, Young Kim, E; Pill Park, S; and Cho, SG. **Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition.** *Cancer Biology & Therapy*. 2008; 7:7, 1080-1089.
- Klaassen CD, Hood AM. **Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular cell proliferation and thyroid hormone metabolism.** *Toxicol Pathol*. 2001; 29, 34-40. Review.
- Kleiman de Pisarev DL, Ferramola de Sancovich AM, Sancovich HA. **Enhanced thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-intoxicated rats.** *J. Endocrinolog. Investig*. 1989; 12:767-772.
- Kleiman de Pisarev DL, Ferramola de Sancovich AM, Sancovich HA. **Hepatic indices of thyroid status in rats treated with hexachlorobenzene.** *J Endocrinol Invest*. 1995; 18, 271-276.
- Kleiman de Pisarev DL, Ríos de Molina MC, San Martín de Viale LC. **Thyroid function and thyroxine metabolism in hexachlorobenzene induced porphyria.** *Biochemical Pharmacology, USA*, 1990; 39:817-825.
- Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massagué J. **Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta.** *Science*. 1993; 260(5107):536-9.
- Koizumi A. **Experimental Evidence for the possible Exposure of Workers to Hexachlorobenzene by Skin Contamination,** *Br. J. Ind. Med*. 1991; 48 (9), 622-268.
- Kolaja KL, Hood AM, Klaassen CD. **The UDP-glucuronyltransferase inducers, phenobarbital and pregnenolone-16alpha-carbonitrile, enhance thyroid-follicular cell apoptosis: association with TGF-beta1 expression.** *Toxicol Lett*. 1999; 106(2-3):143-50
- Koss G, Koransky W. **Studies on the toxicology of hexachlorobenzene. I. Pharmacokinetics.** *Arch Toxicol*. 1975 Nov 20; 34(3):203-12.
- Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. **Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors.** *Cell*. 1996; 87:1069-1078.

- Kraiem Z, Sadeh O, Sobel E. **Thyrotropin acting at least partially via adenosine 3', 5'-monophosphate, exert both mitogenic and antimitogenic effect in cultured human thyroid cells.** J Clin Endocrinol Metab 1990; 70: 497-502.
- Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. **Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells.** Arch Biochem Biophys. 2005; 433:435-446.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. **The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.** Annu Rev Physiol 1998; 60: 619-642.
- Kroemer G, Reed JC. **Mitochondrial control of cell death.** Nat Med. 2000; 6(5):513-9. Review.
- Kyriakis JM, Avruch J. **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** Physiol Rev. 2001; 81(2):807-69. Review.
- Kyriakis JM, Avruch J. **Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines.** Bioessays. 1996; 18(7):567-77.
- Laemmli, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.** Nature (London) 1970; 227, 680-685.
- Lee ER, Kang YJ, Kim JH, Lee HT, Cho SG. **Modulation of Apoptosis in HaCaT Keratinocytes via Differential Regulation of ERK Signaling Pathway by Flavonoids** J Biol Chem Vol. 2005; 280, 36, 9, 31498-31507.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. **Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis.** Mol Biol Cell. 2004; 15: 5001-5011.
- Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE. **Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy.** Antioxid Redox Signal. 2002; 4(5):769-81.
- Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL. **ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways.** Cancer Res. 2001; 61(17):6583-91.
- Lewinsky A, Pawlikowski M, Cardinali DP. **Thyroid growth stimulating and growth inhibiting factors,** Biol Signals 1993b; 2: 313-351.
- Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. **Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination.** Cancer Sci. 2004; 95(8):644-50.
- Li J, Zuo L, Shen T, Xu CM, Zhang ZN. **Induction of apoptosis by sodium selenite in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells: Involvement of oxidative stress and mitochondria.** J Trace Elem Med Biol. 2003; 17:19-26.
- Li SMA, Denomme MA, Leece B. **Hexachlorobenzene: Biochemical effects and synergistic toxic interactions with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.** Toxicol Environ Chem. 1989; 22:215-227.
- Li YF, Shi N, Li HY, Liu YS, Sun M, Hu FY. **Toxicity and oxidative stress on rats by hexachlorobenzene.** Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2006; 24(10):601-4 [Article in Chinese].
- Liesa M, Palacín M, Zorzano A. **Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.** Physiol Rev. 2009; 89(3):799-845.
- Lincz LF. **Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death.** Immunol Cell Biol 1998; 76: 1-19

- Linko P, Yeowell HN, Gasiewicz TA, Goldstein JA. **Induction of cytochrome P-450 isozymes by hexachlorobenzene in rats and aromatic hydrocarbon (Ah)-responsive mice.** National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC 27709. *J Biochem Toxicol.* 1986; (2):95-107.
- Liu GY, Chen KJ, Lin-Shiau SY, Lin JK. **Peroxyacetyl nitrate-induced apoptosis through generation of reactive oxygen species in HL-60 cells.** *Mol Carcinog.* 1999; 25(3): 196-206.
- Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. **Oxidative stress contributes to arsenic induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis.** *J Biol Chem.* 2003; 278:31998-2004.
- Loaiza A, Seisdedos MT, Kleiman de Pisarev DL, Sancovich HA, Randi A, Ferramola de Sancovich AM, Santisteban P. **Hexachlorobenzene, a Dioxine-type compound, increases malic enzyme gene transcription through a mechanism involving the thyroid hormone response element.** *Endocrinology* 1999; 140:4142-4151.
- Longnecker MP, Rogan WJ, Lucier G. **The human effects of DDT (dichloro diphenyl trichloroethane) and PCBs (polychlorinated bisphenyls) and an overview of organochlorines in public health.** *Annu Rev Public Health* 1997; 18: 211-44.
- Lu TH, Hsieh SY, Yen CC, Wu HC, Chen KL, Hung DZ, Chen CH, Wu CC, Su YC, Chen YW, Liu SH, Huang CF. **Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury.** *Toxicol Lett.* 2011; 4;204(1):71-80.
- Madesh M, Hajnoczky G. **VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release.** *J Cell Biol.* 2001; 155:1003-1015.
- Malek NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakides TR, Roberts JM. **A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase.** *Nature.* 2001; 413: 323-327.
- Marlowe JL, Puga A. **Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis.** *J Cell Biochem.* 2005; 96(6):1174-84.
- Maroni M, Fait A. **Health effects in men from long-term exposure to pesticides.** *Toxicology.* 1993; 78:1-180.
- Marshall C. **How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry?** *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11(6):732-6.
- Martin SJ, Green DR. **Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?.** *Cell.* 1995; 82: 349-352.
- Martín SJ. **Apoptosis: suicide, execution or murder?** *Trens in cell biology* 1993; 3:141-44.
- Massague J, Chen YG. **Controlling TGF-beta signaling (review).** *Genes Dev.* 2000; 14: 627-644.
- Massaos J, Hata A. **TGF-beta signaling through the Smad pathway.** *Trends Cell Biology* 1997; 7(5):187-92.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. **Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2000 32 157-170.
- Matikainen TM, Moriyama T, Morita Y, Perez GI, Korsmeyer SJ, Sherr DH, Tilly JL. **Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells.** *Endocrinology.* 2002; 143(2):615-20.
- Matsumura F. **How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals?** *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48, 215-224.

- Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC, Arkinstall S. **Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1.** J Biol Chem. 1997; 272(40):25238-42.
- Meeusen SL, Nunnari J. **How mitochondria fuse.** Curr Opin Cell Biol 2005; 17:389-94. Review.
- Mehmood Z, Williamson MP, Kelly DE. **Metabolism of organochlorine pesticides: The role of human cytochrome P450 3A4.** Chemosphere 1996; 33(4):759-769.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. **NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis inducing factor.** J Biol Chem. 2001; 276(19):16391-8.
- Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. **Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation.** Genes & Dev. 1999; 13: 1181-1189.
- Moustakas A, Heldin CH. **Non-Smad TGF-beta signals.** J Cell Sci. 2005; 118(Pt 16):3573-84.
- Mulder KM. **Role of Ras and MAPKs in TGF-β signaling.** Cytokine Growth Factor Rev. 2000; 11(1-2):23-35.
- Mylchreest E, Charbonneau M. **Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997; 145, 23-33.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. **Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta.** Nature. 2000; 403: 98-103.
- Namazi MR. **Cytochrome-P450 enzymes and autoimmunity: expansion of the relationship and introduction of free radicals as the link.** J Autoimmune Dis. 2009; 25;6:4.
- Namgung U, Xia Z. **Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase.** J Neurosci. 2000; 1; 20(17):6442-51.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. **Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis.** Biochem. Pharmacol. 2000; 59, 65-85.
- Nebert DW. **Genetic differences in the induction of monooxygenase activities by polycyclic aromatic compounds.** Pharmacol. Ther. 1979; 6, 395-417.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon S-H, Youle RJ. **Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.** J Cell Biol. 2001; 153:1265- 1276.
- Norberg E, Gogvadze V, Vakifahmetoglu H, Orrenius S, Zhivotovsky B. **Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing.** Free Radical Biology & Medicine. 2010a; 48, 791-797.
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. **Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF).** Biochem Biophys Res Commun. 2010b; 396(1):95-100.
- Nurse P. **Universal control mechanism regulating onset of M-phase.** Nature. 1990; 344, 503-508.
- Oberhammer F, Bursch W, tiefenbacher R, Froeschel G, Pavelka M, Purchio T, Schultehermann R. **Apoptosis is induced by transforming growth factor-β1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of DNA.** Hapatology 1993; 18, 1238-1246.

- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. **Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis.** EMBO J. 1998; 17(2):384-95.
- Okayasu I, Saegusa M, Fujiwara M, Hara Y, Rose NR. **Enhanced cellular proliferative activity and cell death in chronic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma.** J Cancer Res Clin Oncol. 1995; 121(12):746-52.
- Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI. **Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria.** Nat Genet. 2001; 28:272-275.
- Orrenius S. **Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death.** Drug Metab Rev. 2007; 39(2-3):443-55.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. **Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space.** EMBO J. 2005; 24:1375-1386.
- Owuor ED, Kong AN. **Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways.** Biochem Pharmacol 2002; 64:765-70.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. **Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.** Science. 1995; 269: 682-685.
- Pang XP, Park M, Hershman JM. **Transforming growth factor-beta blocks protein kinase-A-mediated iodide transport and protein kinase-C-mediated DNA synthesis in FRTL-5 rat thyroid cells.** Endocrinology. 1992; 131(1):45-50.
- Pardali K, Moustakas A. **Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer.** Biochim Biophys Acta. 2007; 1775(1):21-62.
- Pasche B. **Role of transforming growth factor beta in cancer.** J Cellular Phys. 2001; 186: 153-168.
- Pendergrass W, Wolf N, Poot M. **Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues.** Cytometry 2004; 61A:162-169.
- Pinheiro TJT, Cheng H, Roder H. **Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome c in lipid membranes from H-2H exchange kinetics.** J. Mol. Biol. 2003; 303:617-626.
- Pisarev M. **Papel de los factores de crecimiento en la regulación tiroidea.** Separata 2005, Fascículo 6, Montpellier, pag.23.
- Pisarev MA, Thomasz L, Juvenal GJ. **Role of transforming growth factor beta in the regulation of thyroid function and growth.** Thyroid. 2009; 19(8):881-92.
- Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. **Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria.** J. Biol. Chem. 2005; 280:6447-6454.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. **p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-b and contact inhibition to cell cycle arrest.** Genes Dev. 1994; 8:9-22.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. **Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.** Cell. 1994; 78(1):59-66.
- Pontillo CA, Garcia MA, Peña D, Cocca C, Chiappini F, Alvarez L, Kleiman de Pisarev D, Randi AS. **Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 Signaling Pathways and**

Cell Migration by Hexachlorobenzene in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Line. *Tox. Sciences.* 2011; 120(2):284-96.

- Poulsen HE, Prieme S, Loft S. **Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion.** *European Journal of Cancer Prevention* 1998; 7:9-16.
- Puga A, Ma C, Marlowe JL. **The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways.** *Biochem Pharmacol.* 2009; 77(4):713-722.
- Raff MC. **Social controls on cell survival and cell death.** *Nature* 1992; 356:397.
- Randi AS, Cocca C, Carbone V, Nuñez M, Croci M, Gutierrez A, Bergoc R, Kleiman de Pisarev, DL. **Hexachlorobenzene is a tumor co-carcinogen and induces alterations in insulin-growth factors signaling pathway in the rat mammary gland.** *Toxicol Sci.* 2006; 89, 83-92.
- Randi AS, Sanchez MS, Alvarez L, Cardozo J, Pontillo C, Kleiman de Pisarev DL **Hexachlorobenzene triggers AhR translocation to the nucleus, c-Src activation and EGFR transactivation in rat liver.** *Toxicol Lett.* 2008; 177(2):116-22.
- Rao KM. **MAP kinase activation in macrophages.** *J Leukoc Biol.* 2001; 69(1):3-10.
- Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL, Eisenberg RA. **Bcl-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy.** *J Immunol* 1995; 155(11):5455-62
- Renner G. **Hexachlorobenzene and its metabolism.** *Toxicol and Environ Chem* 1988; 18:51-78.
- Rodier G, Montagnoni A, Di Marcotullio L, Coulombe P, Draetta GF, Pagano M, Meloche S. **p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser 10 and is not a prerequisite for its proteolysis.** *EMBO J.* 2001; 20: 6672-6682.
- Rodriguez-Iturbe B, Sepassi L, Quiroz Y, Ni Z, Wallace DC, Vaziri ND. **Association of mitochondrial SOD deficiency with salt-sensitive hypertension and accelerated renal senescence.** *J Appl Physiol.* 2007; 102: 255-260.
- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. **Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo.** *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 8):1663-74.
- Roux PP, Blenis J. **ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2):320-44. Review.
- Rozman K, Gorski JR, Rozman P, Parkinson A. **Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene induced porphyria.** *Toxicol Lett* 1986; 30:71-8.
- Rube DA, van der Bliek AM. **Mitochondrial morphology is dynamic and varied.** *Mol Cell Biochem.* 2004; 256-257(1-2):331-9. Review.
- Salganik RI, Albright CD, Rodgers J, Kim J, Zeisel SH, Sivashinskiy MS, Van Dyke TA. **Dietary antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice.** *Carcinogenesis.* 2000; 21(5):909-14.
- Saltis J. **TGF-beta: receptors and cell cycle arrest.** *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 116(2):227-32. Review.
- Sánchez A, Álvarez AM, Benito M, Fabregat I. **Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates.** *J. Biol. Chem.* 1996; 271,7416-7422.
- Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Russel FG, Wagener FA. **Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis.** *PLoS One.* 2009; 20; 4(8):e6688.

- Schell LM, Gallo MV. **Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth.** *Physiol Behav.* 2010; 99(2): 246.
- Schug ZT, Gottlieb E. **Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1788:2022–2031
- Schuster N, Krieglestein K. **Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis.** *Cell Tissue Res* 2002; 307: 1-14.
- Seoane J. **Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control.** *Carcinogenesis.* 2006; 27(11):2148-56.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. **Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1.** *Genes Dev.* 1997; 11:1464–1478.
- Sherr CJ, Roberts JM. **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev.* 1999; 13(12):1501-12. Review.
- Shi Y, Song Y, Wang Y, Wang Y, Liang X, Hu Y, Yu H, Guan X, Cheng J, Yang K. **β -Benzene hexachloride induces apoptosis of rat Sertoli cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNKs and FasL.** *Environ Toxicol.* 2011; 26(2):124-35.
- Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N, Romito A, Dammacco F. **Apoptosis or programme cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms** (editorial). *Ann Ital Med Int* 1995; 10(1):7-13.
- Sinclair PR, Gorman N, Walton HS, Bement WJ, Dalton TP, Sinclair JF, Smith AG, Nebert DW. **CYP1A2 is essential in murine uroporphyrinemia caused by hexachlorobenzene and iron.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 162(1):60-7.
- Skulachev VP. **Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis.** *Apoptosis.* 2006; 11:473–485.
- Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, Alexander D, Stampfer MR, Reed SI. **A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells.** *Mol Cell Biol.* 1994; 14(6):3683-94.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. **Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells.** *Mol Biol Cell.* 2001; 12(8):2245-56.
- Smith AG, Dinsdale D, Cabral JRP. **Goitre and wasting induced in hamsters by hexachlorobenzene.** *Arch Toxicol.* 1987; 60:343–349.
- Sogaza K, Fujii-Kuriyama Y. **Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor.** *J Biochem (Tokyo).* 1997; 122:1075–1079.
- Stover DG, Brierie B, Moses HL. **A delicate balance: TGF- β and the tumor microenvironment.** *J Cell Biochem.* 2007; 101:851–861.
- Su B, Karin M. **Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expresión.** *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 402-411.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. **Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.** *Cell* 1993; 75:1169-78.
- Suen DF, Norris KL, Youle RJ. **Mitochondrial dynamics and apoptosis.** *Genes Dev.* 2008; 22: 1577–1590.
- Sun YL, Zhao Y, Hong X, Zhai ZH. **Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants.** *FEBS Lett.* 1999; 462(3):317-21.
- Sundlof SM, Parker AJ, Simon J, Dorner JL, Hansen LG. **Sub-acute toxicity of hexachlorobenzene in female beagles, including electroencephalographic changes.** *Vet Hum Toxicol.* 1981 Apr;23(2):92-6.
- Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T., Ashizawa K., Kiriya T, Yokoyama N, Yoshimura T, Eguchi K, Nakane P and Nagataki S. **Role of Apoptosis of Thyrocytes in a**

Rat Model of Goiter. A Possible Involvement of Fas System. *Endocrinology* 1998; Vol. 139, No. 8 3646-3653.

- Teramoto T, Kiss A, Thorgeirsson SS. **Induction of p53 and Bax during TGF-beta 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 251(1):56-60.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. **Caspases: enemies within.** *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- To-Figueras J, Sala M, Otero R, Barrot C, Santiago-Silva M, Rodamilans M, Herrero C, Grimalt J, Sunyer J. **Metabolism of hexachlorobenzene in humans: association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population.** *Environ Health Perspect.* 1997 Jan; 105(1):78-83.
- Tosetti F, Vene R, Arena G, Morini M, Minghelli S, Noonan DM, Albini A. **N-(4-hydroxyphenyl) retinamide inhibits retinoblastoma growth through reactive oxygen species-mediated cell death.** *Mol Pharmacol.* 2003; 63:565-73.
- Townsend KJ, Trusty JL, Traupman MA, Eastman A, Craig RW. **Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C.** *Oncogene.* 1998; 17(10):1223-34.
- Toyoshima H, Hunter T. **p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21.** *Cell.* 1994; 78(1):67-74.
- Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. **MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors.** *J Biol Chem.* 2001; 276(19):16484-90.
- Tsujimoto Y, Shimizu S. **Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death.** *Apoptosis.* 2007; 12:835-840.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G. **Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy.** *EMBO J.* 2008; 27, 433-446.
- Valko M, Rhodes CJ. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1): 1-40.
- van Birgelen AP. **Hexachlorobenzene as a possible major contributor to the dioxin activity of human milk.** *Environ Health Perspect* 1998; 106(11):683-688.
- van Raaij JA, Frijters CM, van den Berg KJ. **Hexachlorobenzene-induced hypothyroidism: involvement of different mechanisms by parent compound and metabolite.** *Biochem Pharmacol,* 1993a; 46: 1385-1391.
- van Raaij JA, Kaptein E, Visser TJ, van der Berg KJ. **Increased glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene-treated rats.** *Biochem. Pharmacol* 1993b; 45: 627-631.
- Vansell NR, Muppidi JR, Habeebu SM, Curtis D, Klaassen C. **Promotion of Thyroid Tumors by Pregnenolone-16 α -Carbonitrile (PCN) and Polychlorinated Biphenyl (PCB).** *Toxicological Sciences* 2004; 81(1):50-59.
- Verschuren EW, Jones N, Evan GI. **The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin.** *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 6):1347-61
- Visser TJ, Kaptein E, van Toor H, van Raaij JA, van den Berg KJ, Joe CT, van Engelen JG, Brouwer A. **Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions.** *Endocrinology.* 1993; 133(5):2177-86.
- Vojtek AB, Der CJ. **Increasing complexity of the Ras signaling pathway.** *J Biol Chem.* 1998; 273(32):19925-8.

- Wade MG, Parent S, Finnson KW, Foster W, Younglai E, McMahon A, Cyr DG, Hughes C. **Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead and cadmium.** *Toxicological Sciences* 2002; 67: 207-218.
- Wakefield LM, Roberts AB. **TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis.** *Curr. Opin. Genet.* 2002; 12:22-29.
- Wang F, Kaur S, Cavin LG, Arsura M. **Nuclear-factor-kappaB (NF-kappaB) and radical oxygen species play contrary roles in transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 377(4):1107-12.
- Wang X, Martindale JL, Holbrook J. **Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis.** *J Biol Chem.* 2000; 275:39435-39443.
- Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K. **Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction.** *Blood.* 1999; 93(9):3053-63.
- Weston CR, Davis RJ. **The JNK signal transduction pathway.** *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12(1):14-21.
- Wolf BB, Green DR. **Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.** *J Biol Chem* 1999; 274: 20049-2005
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. **Chromatin Cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.** *J Pathol.* 1984; 142:67.
- Xiao D, Herman-Antosiewicz A, Antosiewicz J, Xiao H, Brisson M, Lazo JS, Singh SV. **Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc 25 C.** *Oncogene.* 2005; 24(41):6256-68
- Yang YL, Li XM. **The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities.** *Cell Res.* 2000; 10(3):169-77.
- Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G. **TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells.** *Oncogene.* 2005; 10; 24(11):1895-903.
- Yuste VJ, Moubarak RS, Delettre C, Bras M, Sancho P, Robert N, d'Alayer J, Susin SA. **Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis inducing factor (AIF) release.** *Cell Death Differ.* 2005; 12:1445-1448.
- Zalba G, José GS, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. **Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase.** *Hypertension* 2001; 38: 1395-1399.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. **Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L).** *Cell.* 1996; 87(4):619-28.
- Zhang AY, Yi F, Jin S, Xia M, Chen QZ, Gulbins E, Li PL. **Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells.** *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:817-828.
- Zhang AY, Yi F, Zhang G, Gulbins E, Li PL. **Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells.** *Hypertension* 2006; 47:74-80.

- Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. **In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway.** Apoptosis. 2008; 13:1465-1478.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3.** Cell. 1997; 90:405-413.