

Tesis Doctoral

Efecto del hexaclorobenceno sobre la homeostasis de las hormonas tiroideas y parámetros funcionales del tejido adiposo marrón

Alvarez, Laura

2004

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

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

This document is part of the Master's and 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:

Alvarez, Laura. (2004). Efecto del hexaclorobenceno sobre la homeostasis de las hormonas tiroideas y parámetros funcionales del tejido adiposo marrón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3735_Alvarez

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Laura. "Efecto del hexaclorobenceno sobre la homeostasis de las hormonas tiroideas y parámetros funcionales del tejido adiposo marrón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3735_Alvarez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Trabajo de Tesis para optar al título
De Doctora de la
Universidad de Buenos Aires

**“Efecto del Hexaclorobenceno sobre la homeostasis de las
hormonas tiroideas y parámetros funcionales del tejido adiposo
marrón”.**

Autora: Lic. Laura Alvarez
Directora: Dra. Diana L. Kleiman de Pisarev

Junio de 2004

03735

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

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Buenos Aires

Doctoral dissertation

**"Effect of Hexachlorobenzene in thyroid hormone homeostasis
and brown adipose tissue functional parameters"**

Author: Laura Alvarez
Tutor: Dra. Diana L. Kleiman de Pisarev

Jun 2004

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

A mi mamá, a quien amo con toda el alma, la mejor madre y guía que uno puede desear tener, a quien le debo todo lo que yo soy.

A mi hermano Hugo....mi eterno ídolo y mi abuelita Yaya, quienes siempre estarán en mi corazón.

A mi compañero Beto, Toty y nuestro "*paquetito*" Chiara, a quienes adoro profundamente. A la vida por permitirme ser feliz haciendo lo que amo....., gracias.

En primer lugar quiero expresarle el más profundo agradecimiento a mi Directora de Tesis, la Dra. Diana L. Kleiman, quien una vez más confió en mí, y me guió en este camino tan duro y fascinante que es la investigación. Una persona que supo comprender y respetarme en mi nuevo rol de becaria *mamá* y una profesional que día a día disfruta el enseñar y contagia la constancia y el amor por la excelencia del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, un grupo hermoso de gente con quienes compartí muy buenos momentos. Andi, una compañera y amiga que me apoyó desde un principio, quien me brindó la posibilidad de comenzar a incursionar en la ciencia. Rodolfo, mi "co-equipar", quien con su calidez y presencia hace tan agradable y llevadero lo difícil que a veces se torna la investigación.

Susi, mi mamá científica, una excelente compañera y amiga con quien aprendí a pensar y disfrute cada experimento y momento compartido.

A Verónica y a Mariana, nuestras nuevas becarias del laboratorio con quienes aún no hemos compartido muchos experimentos, pero son dos personas geniales que tienen todo el empuje necesario para comenzar este arduo y hermoso camino.

A Marcela y la gente del laboratorio de la Dra. Ramos: Carlos, Isabel y Mónica, quienes siempre están dispuestos a dar una mano, inventando transiluminadores y consultando el índice Merck, siempre ayudando a resolver inconvenientes para poder seguir haciendo ciencia en la Argentina.

No quiero dejar de mencionar al grupo de becarios del laboratorio de la Dra. M. J. Obregón: Raquel, Natalia y Elida y a ella misma, por aceptarme en su laboratorio para realizar mi trabajo y dedicarme su tiempo brindándome sus conocimientos. Quienes además de enseñarme varias técnicas en biología molecular, me brindaron su calidez y compañía al estar lejos de casa.

Al grupo de trabajo del laboratorio del Dr. Mario Pisarev, el Dr. Juvenal, Marcos y Mariano quienes me ayudaron en gran parte de mi trabajo doctoral.

Al Dr. Kraviewc, Dr. Canata, Dra Gutierrez, quienes de una u otra manera me brindaron tiempo y conocimientos en mi investigación teórica y práctica.

A Paula Maloberti, a quien enloquecí y aturdí con preguntas y dudas sobre las técnicas moleculares a desarrollar en el laboratorio y siempre me ayudó demostrando un compañerismo excelente.

A Beto, Bocha y Tia Gota, tres personas hermosas llenas de amor que me apoyaron mucho durante toda mi carrera.

A mi prima Male, con quien crecí y compartí los mejores momentos de mi infancia y adolescencia, mi amiga incondicional, quien siempre estuvo presente apoyando mis proyectos y apasionándose con mis ilusiones.

A Nelly, una de las mejores cosas que me dio mi carrera, gracias por tu continuo apoyo y amistad, por ser mi hermana de la vida.

A Chivi, con quien compartí exámenes, campañas, tristezas y alegrías, mi compañera y amiga de siempre y para siempre. A Paula, quien siempre estará en mi corazón.

Por último quiero agradecerle a Beto, mi compañero de casi toda mi vida, por compartir los momentos buenos y malos, entre ellos las alegrías y tristezas vividas durante esta Tesis.

RESUMEN

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental ampliamente difundido. Se ha demostrado que el tejido epididimal blanco, interscapular marrón (TAM), el hígado y la tiroides son blancos primarios de la toxicidad del HCB. Se ha demostrado que el HCB disminuye los niveles circulantes de tiroxina total (T_4) y tiroxina libre (LT_4), sin alterar los de triiodotironina (T_3). Este efecto diferencial indica que varios mecanismos podrían estar involucrados en la homeostasis de las hormonas tiroideas. En el presente trabajo se realizaron curvas de tiempo para la actividad de la T_4 5' deiodinasa I (5' D-I) en tiroides, hígado y riñón, y T_4 5' deiodinasa II (5' D-II) en TAM de ratas Wistar macho tratadas con HCB (1000 mg/kg p.c.), con el propósito de evaluar si un aumento en la actividad de las deiodinasas podría contribuir al mantenimiento de la T_3 sérica. La actividad de la 5' D-I aumentó en la tiroides desde los 21 días. Tanto en riñón como en el TAM la actividad de la 5' D-I y 5' D-II respectivamente disminuyeron en función del tiempo. La actividad total de 5' D-I corporal aumentaba a los 30 días, sugiriendo que la tiroides y el hígado hipertrofiado por el tratamiento crónico con HCB podrían al menos contribuir en parte al mantenimiento de los niveles normales de T_3 sérica. El HCB aumentaba la actividad de la uridin difosfo glucuronil transferasa (UDPGT) involucrada en la glucuronidación de T_4 en forma dependiente del tiempo, sugiriendo que los niveles disminuidos de T_4 sérica podrían deberse en parte a un aumento en la glucuronidación de la misma. La UDPGT- T_3 no se modificaba. El HCB no modificaba los niveles de RNAm de UCP-1 analizados en TAM de ratas en termoneutralidad y con exposición aguda al frío. Previamente demostramos que el HCB aumentaba los depósitos lipídicos en el TAM. En este trabajo medimos la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que no se alteraba por efecto del HCB. La actividad de la lipoproteinlipasa (LPL) aumentaría de forma post.transcriptacional ya que el contenido de RNAm de la misma no se modificaba por el HCB. Tanto el contenido del transportador de glucosa (GLUT-4) , como la captación de 2-deoxiglucosa por el TAM aumentaban en las ratas intoxicadas en forma crónica. Estos resultados sugieren que el aumento en la captación de glucosa junto con el de los ácidos grasos libres, podrían dar cuenta de los depósitos aumentados de lípidos observados histológicamente en el TAM de ratas tratadas crónicamente con HCB.

Palabras claves: Hexaclorobenceno, tiroides, Tejido adiposo marrón, deiodinasa

ABSTRACT

Hexachlorobenzene (HCB) is one of the most widespread environmental pollutants. It has been shown that epididymal white, interscapular brown adipose tissue (BAT), liver and the thyroid are primary targets of HCB toxicity. Findings in our and others laboratory have indicated that treatment of rats with HCB decreases circulating levels of total thyroxine (T_4) and free L-thyroxine (FT4) but does not affect those of triiodothyronine (T_3). Different effects of HCB in terms of serum T_3 and T_4 indicate that several mechanisms are involved in the development of the particular thyroid hormone status. In the present work, time courses were determined for thyroxine 5' deiodinase I (5' D-I) activity in thyroid, liver, and kidney and T_4 5' deiodinase II (5' D-II) activity in BAT in male Wistar rats treated with HCB (1000 mg/kg B.W), to test the possibility that increased deiodinase activity in these tissues might contribute to the maintenance of the serum T_3 level. 5' D-I activity was increased in the thyroid at 21 days and thereafter, and didn't change in the liver. Kidney and BAT 5' D-I activity was decreased in a time dependent manner. Total whole body 5' D-I activity increased by 30 days, suggesting that increased T_4 to T_3 conversion in the thyroid and in the greatly enlarged liver of chronic treated rats contribute at least in part to the maintenance of serum T_3 . Uridine diphosphoglucuronosyl transferase (UDPGT) activity involved in the glucuronidation of thyroid hormones was increased in a time dependent manner, suggesting that decreased serum T_4 levels of HCB treated rats may be due in part to increased glucuronidation of T_4 . T_3 UDPGT was not altered under the same experimental conditions. UCP-1 mRNA levels analyzed on thermoneutrality and in rats acutely exposed to cold were not modified by HCB treatment. We have previously demonstrated that HCB increased BAT lipid depots. To gain further insight into lipid metabolism we measured the activity of the key rate-limiting enzyme acetyl-CoA carboxilase (ACC). Our results showed that HCB did not modify this parameter. Lipoprotein lipase (LPL) activity might be increased in a post transcriptional manner, as LPL mRNA content was not modified by HCB. In response to HCB, BAT glucose transporter (GLUT-4), as well as 2-deoxyglucose uptake increased. These results suggest that the increase in 2-deoxyglucose uptake as well as free fatty acids derived from plasma circulating triglycerides may account for the increased lipid depots observed in BAT from HCB-treated rats.

Keywords: Hexachlorobenzene, thyroid, brown adipose tissue, deiodinase

RELEVANCIA DEL TEMA

Hace medio siglo los científicos hicieron el inquietante descubrimiento de que compuestos manufacturados por el hombre, como diversos plaguicidas, eran acumulados en los cuerpos de personas y animales silvestres. Hoy en día, la contaminación por compuestos químicos está difundida globalmente. No existe ningún lugar ni persona limpia de contaminantes.

Durante los últimos años, las investigaciones científicas sobre este problema se han intensificado y han proporcionado creciente evidencia que vincula a ciertos plaguicidas considerados como disruptores endócrinos, entre ellos el hexaclorobenceno, con un progresivo deterioro en la salud de personas y animales silvestres. La exposición a este tipo de compuestos puede comenzar desde la concepción ya que pasan de la madre al feto a través de la placenta. Al estudiar los disruptores endócrinos, los científicos investigan los mecanismos bioquímicos y moleculares por los cuales estas sustancias pueden obstaculizar los procesos biológicos normales y perjudicar la salud y el bienestar. Trabajos de nuestro y otros laboratorios han evidenciado que los disruptores endócrinos pueden ocasionar daño en dosis extraordinariamente pequeñas, comprometiendo así la salud de la población.

Asimismo los disruptores endócrinos cualquiera sea el mecanismo por el que actúen, pueden alterar mensajes vitales de las hormonas descarriando el desarrollo neurológico, reproductivo, conductual y en el sistema inmunológico.

Se pone así de relevancia la importancia del tema de esta tesis, ya que las hormonas tiroideas juegan un rol muy importante en eventos críticos en el desarrollo temprano, que pueden afectar la función cognitiva y ocasionar daños que comprometen la salud e inteligencia de las próximas generaciones.

Para un mejor conocimiento de las acciones a tomar en contra de la contaminación se debe hacer hincapié en diversos aspectos entre los que sobresale:

- Crear bases científicas para la toma de decisiones políticas en cuestiones públicas.
- Generar la información necesaria a través de la investigación científica acerca del efecto e impacto de los contaminantes sobre diversos aspectos de la salud, entre ellos las alteraciones bioquímicas y moleculares que producen los contaminantes presentes en el medioambiente.

Esta exploración sigue en proceso y está lejos aún de ser completada.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

“ The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status”

Alvarez L.^a, Hernández S^a, Martínez-de-Mena R.^b, Kolliker-Frers R^a, Obregón MJ^b, Kleiman de Pisarev DL^a

^a Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (1121), Buenos Aires, Argentina. Telephone Number: 54-11-4508-3672, #33. FAX : 54-11-4508-3672

^b Unidad de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MJO) , Madrid (28029), España. Telephone Number:34-91-585-4638. FAX: 34-91-585-4587.

Enviado el día 30-06-04 a TOXICOLOGICAL SCIENCES, número de manuscrito: TOXSCI-04-0320.

“Changes in GLUT-4 glucose transport expression and fatty acid availability in BAT of HCB treated rats”

Alvarez L.^a, Kolliker-Frers R^a, Hernández S^a, Kleiman de Pisarev DL^a

^a Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (1121), Buenos Aires, Argentina. Telephone Number: 54-11-4508-3672, #33. FAX : 54-11-4508-3672 (en preparación).

RESUMEN EN CASTELLANO.....	I
RESUMEN EN INGLES.....	II
RELEVANCIA DEL TEMA.....	III
ABREVIATURAS.....	IV

INTRODUCCIÓN

- PLAGUICIDAS, AMBIENTE Y SALUD.....	1
Indicadores biológicos de exposición a los plaguicidas.....	1
HEXACLOROBENCENO: Usos y Patologías.....	2
Biotransformación.....	5
-TOXICOS TIPO DIOXINA.....	7
Mecanismo de acción de los tóxicos tipo dioxina.....	8
-HORMONAS TIROIDEAS.....	11
Tiroides.....	11
Eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo.....	12
BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	14
METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	17
Conjugación.....	17
Desaminación y decarboxilación.....	19
Deiodinación.....	20

Efecto de inductores de enzimas hepáticas sobre el metabolismo de hormonas tiroideas.....	25
- MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE HORMONAS TIROIDEAS	
Acciones genómicas.....	25
Acciones no genómicas.....	27
- FUNCIONES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	28
- HORMONAS TIROIDEAS Y METABOLISMO.....	28
Gasto de energía.....	28
Termogénesis.....	29
Hidratos de carbono.....	29
Lípidos.....	29
Proteínas.....	30
- TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	31
Termogénesis.....	33
Lipogénesis.....	35
Transporte de glucosa.....	38
Regulación hormonal.....	39
- RESULTADOS PREVIOS DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS.....	41
-OBJETIVOS.....	43
-HIPÓTESIS.....	44

- <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
Protocolo experimental.....	45
Protocolo Molecular.....	46
Animales de experimentación.....	47
Materiales.....	47
Tratamiento de animales.....	48
Cepa bacteriana y Plásmidos utilizados.....	49
Medio de cultivo.....	50
Competencia de bacterias.....	50
Transformación de bacterias.....	51
 Procesamiento de las muestras.....	 51
Extracción de RNA total.....	51
Separación de RNA por tamaños.....	52
Transferencias de RNA a membranas de Nylon.....	52
Marcación de las sondas.....	52
Hibridación	53
Autorradiografías y cuantificación.....	54
 - DETERMINACIONES ENZIMATICAS	 54
Determinación de la actividad de las enzimas 5´Deiodinasa Tipo I y II.....	54
Determinación de la actividad de la enzima UDPGT para T ₄ y T ₃	55
Determinación de la actividad de la Acetil CoA Carboxilasa.....	56
Determinación de la actividad de la enzima Lipo-proteinlipasa.....	57
 - Captación de Glucosa.....	 57
- Ensayos de Western Blot.....	58
- Ensayo de luciferaza.....	59

- PARAMETROS MARCADORES DE LA FUNCIONALIDAD Y REGULACION DEL TAM.....	67
Contenido de RNAm de la UCP-1 del TAM.....	67
Contenido de noradrenalina del TAM.....	67
- PARAMETROS DEL METABOLISMO LIPIDICO.....	68
Actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa.....	68
Enzima Lipoprotein-lipasa.....	68
Captación de glucosa.....	69
- <u>RESULTADOS, GRÁFICOS Y TABLAS</u>	70
- <u>DISCUSIÓN</u>	94
- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	103

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
Ac-CoA	Acetil Coenzima A
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGS	ácido graso sintasa
Ahr ó RHA	receptor de hidrocarburos aromáticos
AMPc	ácido 3',5'-adenílico (AMP cíclico)
5'AMP	5'- adenosina monofosfato
AP1	complejo proteico formado por Jun y Fos, factor de transcripción
ARNT	proteína transportadora nuclear del receptor Ah
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
μCi	micro Curies
CRE	elemento de respuesta a AMPc
CYP450	citocromo P-450
DAG	diacilglicerol
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DIT	diiodotirosina
DMSO	dimetilsulfóxido
DEPC	dietilpirocarbonato
DRE	elemento de respuesta a dioxinas
DTT	ditiotreitól
5'D-I	5'deiodinasa tipo I
5'D-II	5'deiodinasa tipo II
ECL	quimoluminiscencia
EDTA	ácido etilen-diaminotetra-acético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EM	enzima málica
ERK-1	quinasa regulada por señales extracelulares-1 (MAPK)

ERK-2	quinasa regulada por señales extracelulares-2 (MAPK)
ES	error estándar
ESM	error estándar de la media
fmol	fentomol
Fos	factor de transcripción, perteneciente a la cascada de transducción de señales de diferenciación y/o crecimiento, gen de respuesta temprana.
FSH	hormona folículo estimulante
GAP	proteína activante de la GTPasa
GAPDH	gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa
GH	hormona de crecimiento
GDP	5'- difosfato de guanosina
GLUT-1	transportador de glucosa tipo 1
GLUT-2	transportador de glucosa tipo 2
GLUT-3	transportador de glucosa tipo 3
GLUT-4	transportador de glucosa tipo 4
GMP	5'- monofosfato de guanosina
GMPc	ácido guanosín- 3', 5'-guanosínico (GMP cíclico)
G6PD	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GRB2	proteína de unión a receptores de factores de crecimiento
GSK	glucógeno sintetasa quinasa
GTP	5'- trifosfato de guanosina
HAP	hidrocarburos aromáticos polihalogenados
³ H-2DOG	2-deoxiglucosa tritiada
HCB	hexaclorobenceno
HDL	lipoproteína de alta densidad
HHA	hidroxilasas de hidrocarburos aromáticos
HMB	hidroximetilbilano
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSP	proteínas de "heat shock" o de shock térmico
HT	hormonas tiroideas

5-HT	serotonina
IE	genes de respuesta temprana
IF	inhibidores de fosfatasas
IP ₃	inositol-3-fosfato
IHS	índice hepatosomático
IRS-1	sustrato del receptor de insulina-1
JAK	quinasa Janus
JNK	proteína quinasa activada por extremo amino terminal de
Jun	
Jun	factor de transcripción, perteneciente a la cascada de transducción de señales de diferenciación y/o crecimiento, gen de respuesta temprana
Kd	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LG3PD	L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
LH	hormona luteinizante
LHS	lipasa hormono sensible
LDL	lipoproteína de baja densidad
LPL	lipoproteinlipasa
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos (= ERK)
MAPKK	quinasa de MAPK (= MEK)
MARCKS	sustrato de quinasa C- rico en alanina miristilada
MEK	quinasa de MAPK (= MAPKK)
MIT	moniodotirosina
MMI	1-metil-2-mercapto-imidazol o metimazol
MW	proteínas marcadoras de peso molecular
Myc	factor de transcripción, gen de respuesta temprana
NA	noradrenalina
NADPH	nicotinamida adenina difosfato reducida
NIS	simporter sodio/ioduro
NBT	azul de nitrotetrazolium

NPY	neuropéptido Y
ODC	ornitina decarboxilasa
PA	ácido fosfatídico
PAGE	geles de poliacrilamida
p.c.	peso corporal
PC	fosfatidil colina
PCB	bifenilo policlorado
PCP	pentaclorofenol
PCT	porfiria cutánea tarda
PCP	pentaclorofenol
³² P-dCTP	deoxicitosina trifosfato fosforilada
PE	fosfatidiletanolamina
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
pg	picogramos
PI	fosfatidil inositol
PI3K	quinasa de fosfatidilinositol-3
PK	proteína quinasa
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PS	fosfatidil serina
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PKCa	proteína quinasa C, subfamilia atípica
PKCc	proteína quinasa C, subfamilia convencional
PKCn	proteína quinasa C, subfamilia nueva
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC γ	fosfolipasa C - gamma
PLD	fosfolipasa D
pmol	picomol
PMSF	para metil sulfonil- fluoruro
poli-GT	poli glutámico- tirosina, péptido sintético, sustrato para PTK
PTK	proteína quinasa de tirosina

PTP	proteína fosfatasa de tirosina
PTU	6-n-propil-2-tiouracilo
RAF	proteínas quinasas con actividad fosforilante en serina/treonina
RAS	proteína-G pequeña, monomérica, oncoproteína de 21 Kd
REGF	receptor de factor de crecimiento epidérmico
RIA	radio inmunoanálisis
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ácido mensajero
RT ₃	receptor de triiodotironina
rT ₃	3,3',5'triiodotironina
rT ₄	3,3',5,5'tetraiodotironina
RTH	receptor de hormonas tiroideas
RTK	receptor con actividad de quinasa de tirosina
SAPK	proteína quinasa activada por estrés
SDS	dodecil sulfato de sodio
SH2	dominio homólogo a SRC-2
SH3	dominio homólogo a SRC-3
SHC	proteínas fosforiladas en tirosina, en respuesta al EGF e insulina
SOS	proteína intercambiadora de GDP-GTP
SRC	oncoproteína de membrana, no receptora, de 60 Kd, pp60 ^{src} , con actividad de quinasa de tirosina
c-SRC	proteína SRC celular
v-SRC	proteína SRC viral
T ₃	3,3',5-triiodotironina
T ₄	3,3',5,5-tetraiodotironina ó tiroxina
TAB	tejido adiposo blanco
TAM	tejido adiposo marrón
TBS	buffer Tris- NaCl
TBSTB	buffer Tris- NaCl- seroalbúmina bovina- Tween

TCA	ácido tricloro acético
TCDD	2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina
TCHQ	tetraclorohidroquinona
TCBQ	tetraclorobenzoquinona
TETRAC	3,3',5,5-acido tetraiodotiroacético
TGB	globulina ligadora de T ₄
TGF- α	factor de crecimiento tumoral - alfa
TK	quinasa de tirosina
TLC	cromatografía en capa delgada
TNF- α	factor de necrosis tumoral- alfa
TPA	12-O- tetradecanoilforbol 13-acetato
TPO	tiroperoxidasa
TRIAC	ácido 3,3',5 triiodotiroacético
TRE	elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TTR	transtiretina, proteína transportadora de hormonas tiroideas
TRAP	proteína auxiliar del receptor de hormonas tiroideas
Tris	tri-hidroximetil- aminometano
TRH	factor liberador de tirotrófina
TSH	tirotrófina
tyr	tirosina
Tyr-K	quinasa de tirosina
UA	unidades arbitrarias
UI	unidades internacionales
UCP-1	proteína desacoplante 1
UCP-2	proteína desacoplante 2
UCP-3	proteína desacoplante 3
UDPGA	ácido uridín difosfo glucurónico
UDPGT	uridín difosfato glucuroniltransferasas
XRE	elemento de respuesta a xenobióticos

INTRODUCCION

PLAGUICIDAS, AMBIENTE Y SALUD

Se llama pesticida o *plaguicida* al amplio conjunto de sustancias químicas, orgánicas o inorgánicas, o sustancias naturales que se utilizan para combatir plagas, malas hierbas o enfermedades de las plantas. Se emplean para eliminar insectos, ácaros, hongos, roedores, etc. Se agrupan según sus usos en: insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, acaricidas, defoliantes, mitocidas, rodenticidas, anticriptogámicos. Las principales categorías son: Insecticidas, Fungicidas, Insecticidas y Herbicidas (Manual de Plaguicidas, 1999).

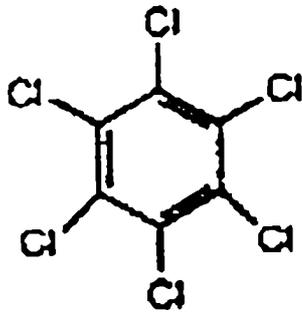
De distintos modos y en mayor o menor grado, diferentes grupos y sectores de la población pueden estar expuestos a los plaguicidas. Algunas exposiciones son accidentales, otras pueden ser continuas como la exposición profesional de personas que preparan, mezclan o aplican plaguicidas, o la exposición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

Indicadores biológicos de exposición a los plaguicidas

En general, la exposición humana a los plaguicidas se estima midiendo las concentraciones existentes en el medio ambiente (aire, agua y alimentos). En algunos casos, sin embargo, puede obtenerse información sobre el grado de exposición analizando la concentración del plaguicida en los tejidos y humores humanos. Esta forma de investigación, denominada *vigilancia biológica*, resulta especialmente útil en caso de exposición simultánea por distintas vías.

HEXACLOROBENCENO: Usos y Patologías

El Hexaclorobenzeno (HCB) (**Figura 1**), es un hidrocarburo aromático polihalogenado, de carácter altamente lipofílico. Fue utilizado como fungicida para el tratamiento de semillas, especialmente de cereales, para combatir *Tilletia foetidae* y *Tilletia caries*, así como formando parte de otros fungicidas y herbicidas como contaminante (Who, 1974). También ha sido utilizado como agente antimicrobiano para la preservación de maderas (Courtney, 1979). En 1975 fue prohibida su producción, sin embargo, se libera al medio ambiente como subproducto de procesos industriales y de incineración (Brucker -Davis, 1998). Se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, es de alta persistencia, se degrada muy lentamente y se acumula en los tejidos grasos de todos los seres vivos (Minh y col., 2001). Diferentes autores en España (Garrido, 1990; De la Riva y Anadón, 1991) y en otros países (Frank y col., 1985; Dogheim y col., 1988; Pinto y col., 1990) han reportado la presencia de HCB en leche y productos de consumo diario. En un estudio realizado en las aguas del Río de la Plata, por investigadores argentinos y uruguayos, se encontraron cantidades de HCB más altos que los permitidos para la calidad de vida de los organismos acuáticos (CARP, 1989). Investigadores santafesinos, observaron trazas de varios pesticidas organoclorados (heptaclorociclohexano, HCB, aldrin, dieldrin, endosulfan y DDT) en leche de vaca pasteurizada para el consumo humano (Maitre y col., 1994), sin embargo, aunque algunos estaban en altas concentraciones, las medias de estos valores fueron menores que el límite de tolerancia dictado por FAO/OMS. Estos datos denotan la necesidad permanente de reducir las fuentes de contaminación y de vigilar la presencia de dichos plaguicidas en los alimentos de origen animal (OMS-PNUMA, 1992).



HCB

Figura 1. Estructura del Hexaclorobenceno.

La Environmental Protection Agency (EPA, 1984) lo considera un compuesto de toxicidad reconocida, presentando una Dosis Letal 50 (DL₅₀) de 10,000 ppm cuando se suministra oralmente a ratas. En un episodio de intoxicación aguda de humanos en Turquía en 1955, 3000 a 4000 personas que habían consumido granos de trigo contaminados con el pesticida, presentaron signos tóxicos, tales como porfiria y disfunciones tiroideas (Smith y col., 1987). Luego de 2 o 3 décadas, se registró un aumento de la incidencia de bocio (59 % en mujeres y 23,5 % en hombres) respecto a los niveles basales de dicha población, encontrándose elevados metabolitos de porfirinas en orina y niveles de HCB en leche materna (Peters y col., 1987; Cripps y col., 1984).

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

La administración crónica de HCB produce disfunciones reproductivas y tiroideas (Foster y col., 1992, 1993; Alvarez y col., 2000; Kleiman de Pisarev y col., 1989; 1990), porfiria (Cabral and Shubik, 1986), cáncer de mama (Iskan y col., 2002) y cáncer de tiroides y cerebro (Grimalt y col., 1994). Estos efectos podrían ser más relevantes que los agudos, debido a que el HCB se encuentra en niveles residuales en el medio ambiente y se acumula en hígado, tejido adiposo blanco y marrón, grasa periovárica, tiroides y adrenal (Meironyte Guvenius y col., 2001).

Biotransformación

Muchos de los efectos tóxicos producidos por el HCB requieren de su biotransformación en metabolitos oxidativos como el pentaclorofenol (PCP) y la tetraclorobenzoquinona (TCBQ) o tetraclorohidroquinona (TCHQ) (van Raaij y col., 1993) (**Figura 2**). Se ha reportado que el PCP, principal metabolito del HCB, administrado en forma intraperitoneal a ratas, causa una disminución del 65% en los niveles séricos de T_4 , entre las 6 y las 24 horas; mientras que la TCHQ produce una disminución de la T_3 sérica del 85% luego de 24 horas. Dosis similares de HCB, no tuvieron efecto sobre los niveles séricos de T_3 ni de T_4 , mostrando que son necesarias dosis mucho mayores del toxico (van Raaij y col., 1991) que de sus metabolitos. Ambos, PCP y TCBQ tienen una alta afinidad de unión a la proteína transportadora de hormonas tiroideas, transtiretina (TTR) (van Raaij y col., 1993; den Besten y col., 1993), desplazando a las hormonas tiroideas que quedaría en su estado libre para ingresar a las células. Experimentos de Koss y col. (1975) con HCB marcado revelaron que en ratas, al menos la mitad de la cantidad de HCB es eliminado como metabolitos. Parte de los metabolitos aparecen en la orina en forma de glucurónido- PCP o glucurónido- TCHQ (Ahlborg y col., 1974, 1978; Braun y col., 1977). Debets y col. (1980) encontraron que el PCP acelera el desencadenamiento de porfiria producido por HCB, incrementando la excreción de porfirinas urinarias totales (Visser y col., 1993; den Besten y col., 1993).

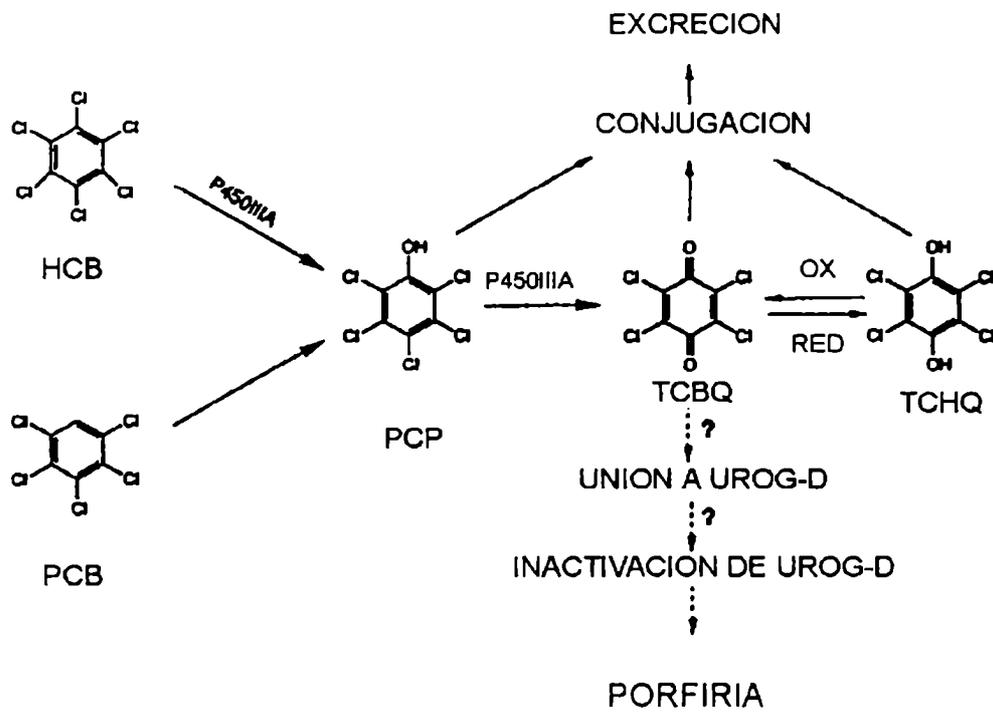


Figura 2. Formación de pentaclorofenol (PCP) y tetraclorobenzoquinona (TCBQ) como metabolitos comunes de HCB y PCB. Rol propuesto de la TCBQ en la inducción de porfiria.

TOXICOS TIPO DIOXINA

Los tóxicos “tipo dioxina” incluyen a las dibenzo-p-dioxinas polihalogenadas, dibenzofuranos, bifenilos policlorados, naftalenos, azo y azoxibencenos, los cuales poseen toxicológicamente, propiedades muy similares, siendo la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), el compuesto más tóxico de esta familia (Poland y Knutson, 1982; Fisher y col.,1989). Son compuestos extremadamente estables, tanto en el ambiente como en los organismos vivos, que se bioacumulan en la cadena alimentaria. Debido a que son altamente lipofílicos e insolubles en agua, se concentran en los sedimentos y son almacenados en el tejido graso de peces, aves, reptiles y mamíferos (Birnbaum, 1994).

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

Los efectos de este tipo de compuestos, pueden agruparse en tres clases de alteraciones **a- metabólicas**, producidas por cambios en la actividad y niveles enzimáticos; **b- en la homeostasis hormonal**, desencadenadas por cambios en los niveles hormonales y/o sus receptores y **c- en el crecimiento y diferenciación**, producidos a partir de cambios en los factores de crecimiento y sus receptores.

Mecanismo de acción de los tóxicos tipo dioxina.

Matsumura (1994) propuso que los tóxicos tipo dioxina, en particular la TCDD, después de su ingreso a la célula a través de la membrana plasmática, se unen al receptor citosólico Ah (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, la c-Src, y una proteína tipo inumofilina (XAP2).

Se han propuesto que existirían al menos 2 caminos de respuesta para la unión del ligando al AHR: 1- el camino de la respuesta adaptativa y 2- el camino de la respuesta tóxica (**Figura 3**). Schmidt and Bradfield, (1996) definen como **respuesta adaptativa**, a la inducción de enzimas que metabolizan xenobióticos, Una variante de éste sistema de detoxificación, es que transforma a los compuestos inductores en metabolitos electrofílicos que pueden combinarse con macromoléculas celulares, conduciendo a funciones celulares alteradas y genotoxicidad (Canonero y col., 1997), en este caso se habla de una **respuesta tóxica (Figura 3)**.

Matsumura (1994) propuso que seguidamente a la unión del ligando al AHR, el dímero AHR-TCDD se separa del resto del complejo y se transloca al núcleo, formando un heterodímero con la proteína translocadora nuclear del receptor Ah (ARNT). Este heterodímero modula la expresión de genes que poseen en sus promotores elementos XRE (elementos que responden a xenobióticos) o DRE (elementos que responden a dioxinas).

La acción más común de todos los químicos "tipo dioxina" es la inducción de enzimas que metabolizan xenobióticos en varios tejidos, particularmente en hígado (Nebert, 1979). El fenómeno de inducción más estudiado ocurre sobre el citocromo P4501A1 (CYP1A1) y en menor medida 1A2. Se ha demostrado, que los genes que codifican para estos citocromos, poseen una secuencia específica

en el ADN, 5'- GCGTG - 3' a menudo llamada XRE ó DRE, al cual se une el complejo formado por el ARNT y el receptor citosólico Ah unido a su ligando, causando de esta manera la activación de su expresión para producir mayor cantidad de ARNm para la síntesis de la proteína CYP1A1 (**camino 1, Figura 3**).

Se ha propuesto una segunda vía de acción en la que el receptor Ah se separa del complejo que forma con las HSP, liberando a la proteína SRC y aumentando su actividad de quinasa de tirosina (PTK). La activación de SRC en el citosol, podría desencadenar fosforilaciones directas sobre otras proteínas importantes del citosol, membrana plasmática (receptores de factores de crecimiento) y otras organelas intracelulares para producir cambios funcionales (**camino 2, Figura 3**). La PTK interna de la SRC, podría actuar como desencadenante de la vía de transducción de señales de receptores de factores de crecimiento, a través de RAS y la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que podrían fosforilar factores de transcripción, tales como AP-1. Según Matsumura (1994) ambos caminos 1 y 2, podrían igualmente afectar procesos transcripcionales.

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

HORMONAS TIROIDEAS

Tiroides

La tiroides es una glándula endócrina que posee importantes funciones en las distintas etapas de la vida. Esta formada por dos lóbulos conectados entre sí por un istmo, y presenta una alta vascularización e inervación simpática. En todos los vertebrados adultos la tiroides posee un patrón folicular (**Figura 4**). Estos folículos encapsulados por tejido conectivo rodean un coloide, el cual contiene a la tiroglobulina (TG), una glicoproteína de 660 KDa que constituye el 75% de las proteínas tiroideas.

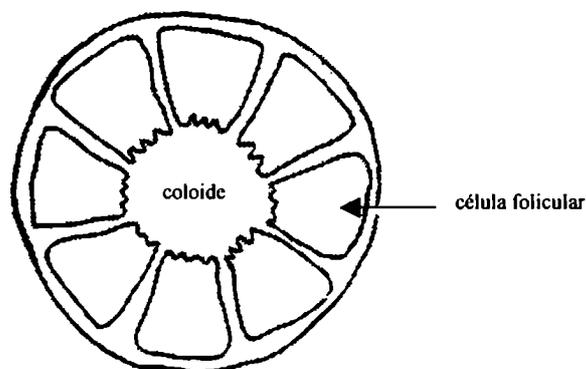


Figura 4: Representación esquemática del folículo tiroideo.

Su función, es sintetizar las hormonas tiroideas (HT), T_3 (3,3',5-triiodotironina) y T_4 (3,3',5,5'-tetraiodotironina o tiroxina), a partir del yodo que se incorpora al organismo, mediante la absorción intestinal de la comida y el agua que se consume. El mecanismo de concentración de yoduro en la tiroides es considerado

de importancia fisiológica, ya que aporta iodo a la glándula en forma específica y eficiente. Este sistema es una importante adaptación celular para acumular este elemento escaso en el ambiente (constituye sólo el $10^{-4}\%$ de la litósfera). En condiciones fisiológicas la tiroides es capaz de concentrar unas 20-25 veces el iodo del plasma.

Eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo

La glándula tiroides se encuentra bajo el control de factores estimulatorios e inhibitorios, y presenta además cierto grado de autorregulación.

Los órganos que ejercen un control directo en su regulación son: la hipófisis (o glándula pituitaria) que produce la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH) y el hipotálamo que produce la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) (secretada por las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo). Por otro lado es controlada por el sistema nervioso simpático y parasimpático a través de adrenalina y noradrenalina de sus terminaciones nerviosas. Las tres glándulas mencionadas forman lo que se denomina el eje hipotálamo- hipófiso – tiroideo, el cual se mantiene en un equilibrio dinámico mutuamente balanceado por retroalimentación positiva y/o negativa de sus productos (**Figura 5**). Una disminución en los niveles séricos de las hormonas tiroideas produce una retroalimentación positiva de largo alcance sobre el hipotálamo, y una retroalimentación corta sobre la hipófisis, induciendo de este modo la liberación de TRH y TSH respectivamente. Se logra así un estímulo positivo sobre la tiroides para secretar hormonas tiroideas y retornar a los niveles séricos normales de las mismas. Una elevación sérica de estas presenta el mismo esquema de regulación con una retroalimentación negativa.

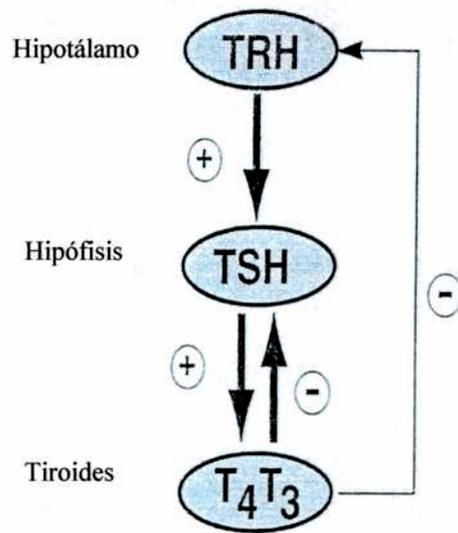


Figura 5: Esquema del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo.

BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

La tiroides produce dos hormonas: 3,3',5,5'- tetraiodotironina o tiroxina (T_4) y 3,3',5 - triiodotironina (T_3) (**Figura 6**).

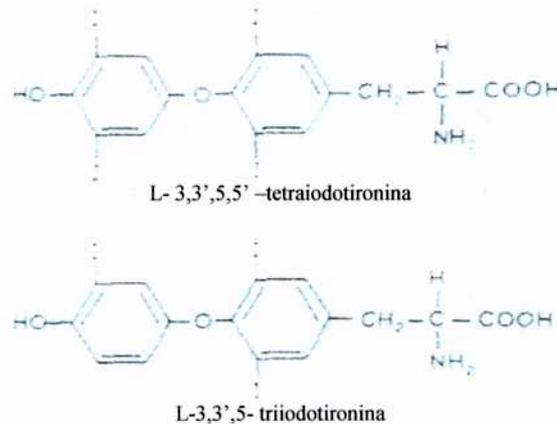


Figura 6: Estructura de las hormonas: T_4 y T_3 .

Los eventos involucrados en la biosíntesis de estas hormonas son: **1)** transporte activo del yoduro en contra de su gradiente electroquímico a través de la membrana basolateral de la célula folicular por el simporter sodio/yoduro (NIS) (Carrasco y col, 1993). **2)** En la interfase célula-coloide, el yoduro es oxidado por la tiroperoxidasa tiroidea (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno y **3)** El yodo oxidado es incorporado en algunos residuos de tirosina de la tiroglobulina (TG), mediante un proceso denominado organificación de yoduro, que es catalizado por la TPO.

El acoplamiento de un residuo de monoiodotirosina (MIT) y uno de diiodotirosina (DIT) da lugar a la formación de T_3 , mientras que el de dos residuos de DIT forma

T₄. La TG iodada es reabsorbida por endocitosis a través de la membrana apical de la célula y es degradada en los lisosomas de las células foliculares, liberándose T₄, T₃, DIT y MIT. Gran parte de la T₃ segregada por la tiroides proviene no sólo de la acción de los lisosomas sobre la tiroglobulina iodada, sino de la deshalogenación in situ de la T₄ por la enzima 5' deiodinasa I (5'D-I) de tiroides.

Las hormonas, son secretadas a través de la membrana basolateral mientras que las iodotirosinas son deiodinadas, pasando una pequeña proporción a circulación **(Figura 7)**.

Tanto la T₄ como la T₃ circulan en sangre unidas a sus proteínas transportadoras con diferentes afinidades. En el caso de los humanos estas son: una globulina ligadora de T₄ (TBG) que transporta alrededor del 70% de las HT; la transtiretina (TTR) o prealbúmina, que transporta alrededor del 10-15 % de las HT; la albúmina que transporta un 15-20%, y entre el 3 – 6% de HT son transportadas por lipoproteínas, presentando todas ellas mayor afinidad por T₄ que por T₃. En ratas las proteínas que intervienen en el transporte de las HT son la TBG y la prealbumina, siendo la ésta la que presenta mayor afinidad por las HT. Todas estas proteínas transportadoras son sintetizadas en el hígado. La fracción de hormona libre (2 ng % para T₄ y 0,4 ng % para T₃) que no se fija a las proteínas transportadoras es la que tiene importancia fisiológica ya que es la que se encuentra en condiciones de penetrar en los tejidos.

Pequeñas cantidades de rT₃ se han detectado en la tiroglobulina de tiroides humana y de rata, en un rango de 1-4,7 % de la cantidad de T₄. La relación entre rT₃ y T₄ en tiroides humana normales varían entre 0,01 a 0,05.

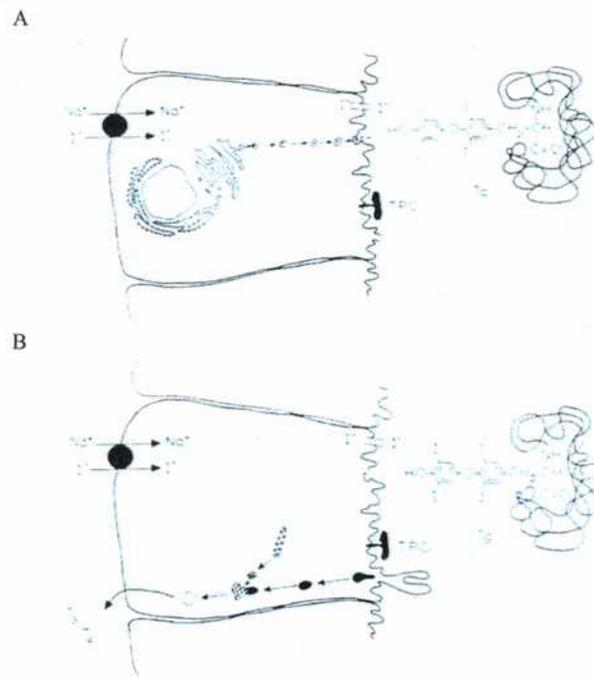


Figura 7: Esquema de la vía biosintética de las hormonas tiroideas.

La célula folicular tiroidea está esquematizada con su cara basolateral hacia la izquierda y la cara apical hacia la derecha en contacto con el coloide. **A:** Concentración del yoduro y síntesis y transporte de la TG hacia el coloide. **B:** Endocitosis e hidrólisis de la TG yodada y liberación al torrente sanguíneo de la T₃ y T₄.

METABOLISMO DE HORMONAS TIROIDEAS

Existen cuatro vías para la metabolización de las hormonas tiroideas: la conjugación con sulfatos y glucuronatos, la decarboxilación, la desaminación y la deiodinación, (**Figura 8**).

Conjugación

Esta función la realizan fundamentalmente las **uridín difosfato glucuroniltransferasas (UDPGTs)** con diferentes actividades y especificidades entre especies y entre diferentes estadios del desarrollo fetal (Dutton y Burchell, 1977). Existen al menos 3 grupos de isoenzimas de UDPGTs responsables del metabolismo de hormonas tiroidea: **tipo 1**, bilirrubina-UDPGT (produce glucurónidos de bilirrubina, de T₄ y de T₃ reversa) inducida por fibratos; **tipo 2**, fenol-UDPGT (glucurónidos de fenoles, de T₄ y de T₃ reversa) inducida por metilcolantreno y compuestos tales como los PCBs, dioxinas y HCB; y **tipo 3** o androsterona-UDPGT (glucurónidos de androsterona y de T₃) que es poco influenciada por xenobióticos (Visser, y col., 1993, 1996).

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

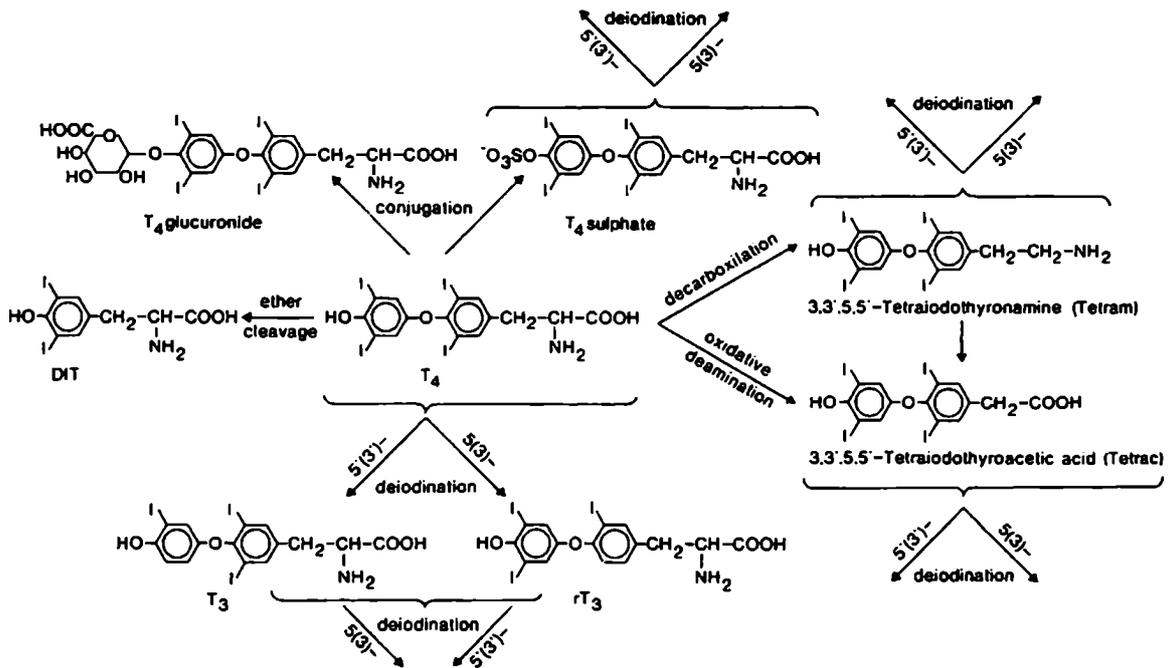


Figura 8: Vías de metabolización de las hormonas tiroideas.



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

En el hepatocito las hormonas tiroideas son conjugadas con sulfatos y glucuronatos, pasando a la bilis. Una gran parte de estas hormonas es deconjugada en la luz del intestino y reabsorbida, retornando a la circulación y el resto es eliminado del organismo.

La sulfoconjugación es un camino alternativo del metabolismo de las hormonas tiroideas que es dependiente de energía y está mediado por sulfotransferasas. La sulfatación de las iodotironinas facilita la deiodinación rápida. Por otro lado las iodotironinas con dos átomos de yodo en el anillo fenólico son preferencialmente conjugadas con ácido glucurónico, mientras que las que poseen solo un átomo de yodo son sulfatadas con el siguiente orden de preferencia: 3'-T₁; 3,3'-T₂; >T₃; >rT₃; >T₄. Se ha descrito en la bibliografía una actividad enzimática de desulfatación de T₃, pero no de T₄, que ocurre en preparaciones microsomales de hepatocitos humanos y de ratas. La importancia de esta reacción para el metabolismo de las hormonas tiroideas es desconocida.

Desaminación y decarboxilación: la desaminación de la cadena lateral de tirosina de T₄ y T₃ lleva a la producción de los ácidos 3,3',5,5' tetraiodotiroacético (TETRAC) y 3,3',5 triiodotiroacético (TRIAC). En sujetos normales, sólo entre el 1 y 2% de T₄ es metabolizada a TETRAC, mientras que alrededor del 14% de T₃ es transformado en TRIAC. En algunas condiciones fisiológicas, como por ejemplo en ayuno, la producción de TRIAC se ve considerablemente aumentada (Everts y col. 1994).

Deiodinación: Las deiodinasas son las enzimas responsables de la deshalogenación de las hormonas tiroideas y sus derivados (**Figura 9**). Son seleno-proteínas tejido específicas y producen por deshalogenación de T_4 una fracción importante de la T_3 que está disponible en cada tejido (**Figura 10**). La proporción de saturación de receptores para producir una respuesta biológica óptima es tejido-específico. La mayoría de los tejidos necesitan para su correcto funcionamiento ocupar al menos el 50% de los receptores nucleares de T_3 , en ratas eutiroideas. Existen distintos tipos de deiodinasas que se clasifican según la posición del átomo de yodo a remover durante la reacción de deshalogenación: la 5' deiodinasa, elimina el yodo ubicado en la posición 5' del anillo fenólico, y la 5 deiodinasa cataliza la remoción del yodo ubicado en la posición 5 del anillo de tirosilo.

Mediante la 5' deiodinación se obtiene T_3 a partir de T_4 , por lo que se la considera una reacción de bioactivación de las hormonas tiroideas. Existen dos isotipos de esta enzima, la tipo I y II (5' D-I y 5' D-II) que se diferencian en cuanto a su preferencias de sustrato, grado de susceptibilidad a la inhibición por 6-n-propil-2-tiouracilo (PTU), respuesta a perturbaciones fisiológicas, y ubicación celular. La 5' D-I se distribuye a nivel subcelular de una manera tejido específica localizándose en el hígado, en el retículo endoplasmático y en el riñón y tiroides en la membrana plasmática. Esta isoforma presenta mayor afinidad por la 3,3',5' triiodotironina (rT_3), luego le siguen la T_4 y por último la T_3 . Concentraciones micromolares de Propil-tiouracilo (PTU) bloquean completamente su actividad. Esta isoforma se localiza principalmente en tiroides, riñón e hígado y en menor cantidad en la adenohipófisis.

La 5' D-II posee mayor afinidad por T_4 que por rT_3 , por lo que es la productora de T_3 en los tejidos en los que se expresa: sistema nervioso central, adenohipófisis, tejido adiposo marrón y placenta. La 5' D-II se localiza en el retículo endoplasmático del TAM. Otra característica que la diferencia de la tipo I es que es resistente a la inhibición por PTU (**Figura 11**).

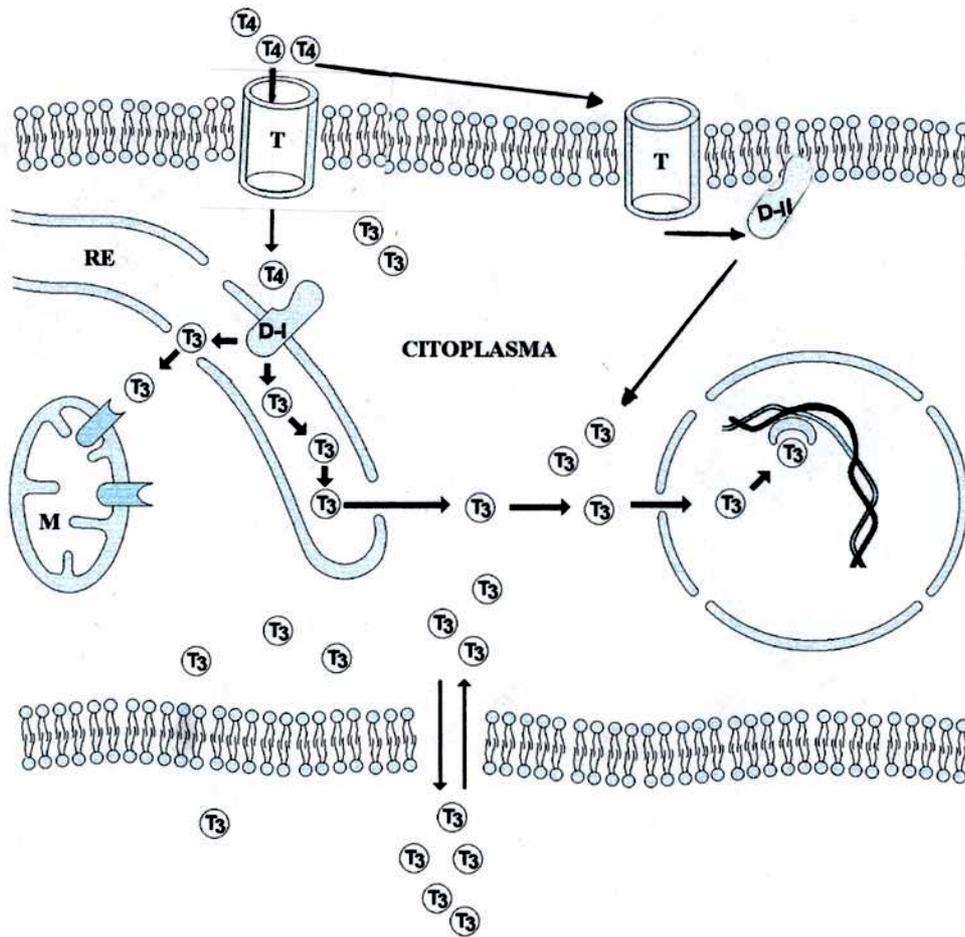


Figura 9. Esquema de la ubicación subcelular de las Deiodinasas.

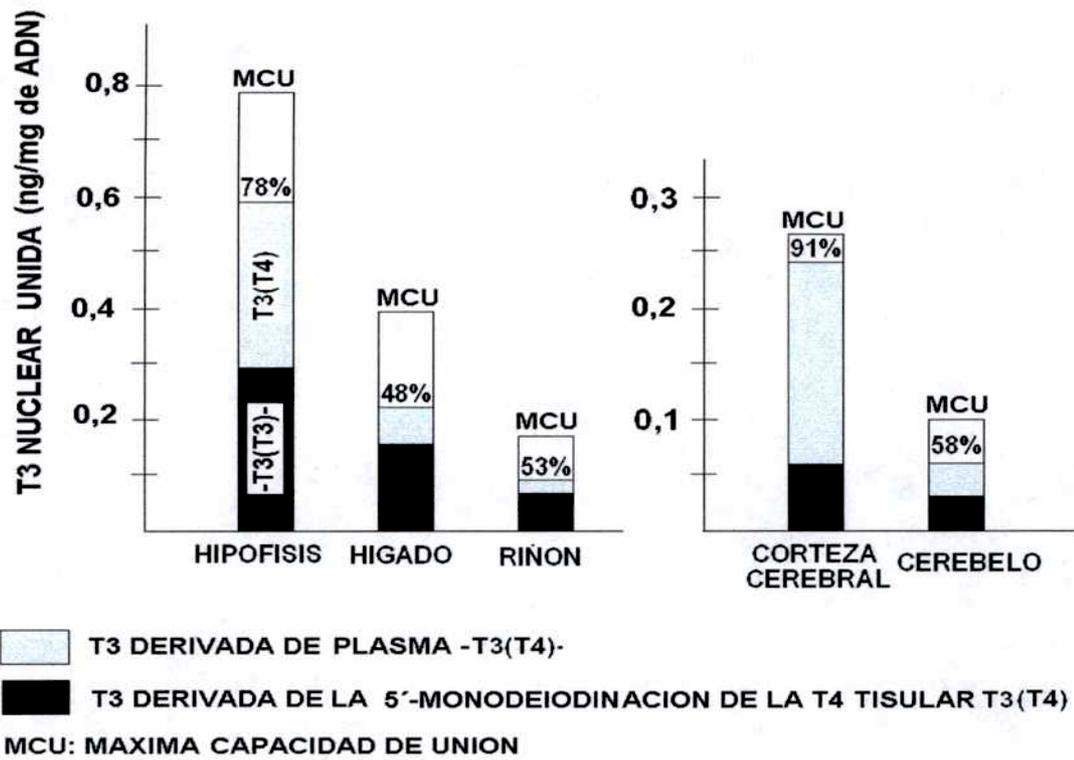


Figura 10. Esquema de saturación de receptores tisulares de T₃

La 5' deiodinación del anillo tirosilo, constituye la ruta más importante de degradación de T_3 e inactivación de T_4 (dando $3,3'$ - T_2 y rT_3 respectivamente) y está catalizada por la enzima 5' deiodinasa tipo III. Este tipo de deshalogenación a diferencia del anterior es una vía de bioinactivación. Constituye una reacción clave para reciclar el yoduro y además produce rT_3 un sustrato que compite con T_4 en la 5' deiodinación, lo que representa un importante modo de regulación del metabolismo y acción de las hormonas tiroideas. Se localiza principalmente en la corteza cerebral y en la piel de ratas adultas, pero también se expresa en placenta y en varios tejidos fetales de la rata y sirve para proteger el cerebro y otros tejidos fetales de niveles excesivamente altos de HT (Bates y col., 1999).

Su expresión en la placenta parece ser independiente del estado tiroideo, mientras que su actividad en el cerebro está incrementada en el hipertiroidismo y disminuida en el hipotiroidismo (Sanders y col., 1999).

Del 100% de la T_4 secretada diariamente por la tiroides, el 70% es deiodinada en los tejidos periféricos, produciéndose iguales cantidades de T_3 y rT_3 . El 70% de la deshalogenación periférica de T_4 , es realizado por el hígado, el 30% restante es deiodinado en los demás tejidos blanco. En relación a la T_3 , entre el 10% y el 30% es originada en la tiroides, el restante 70-90% es originada por deiodinación periférica extratiroidea. Entre el 95 y 98% de la rT_3 producida diariamente es generada por deiodinación de T_4 y solo una pequeña cantidad de rT_3 es producida por la tiroides. La subsecuente deiodinación de T_3 y rT_3 lleva a la producción de tres tipos de T_2 ($3,5$ - T_2 , $3,3'$ - T_2 y $3',5'$ - T_2).

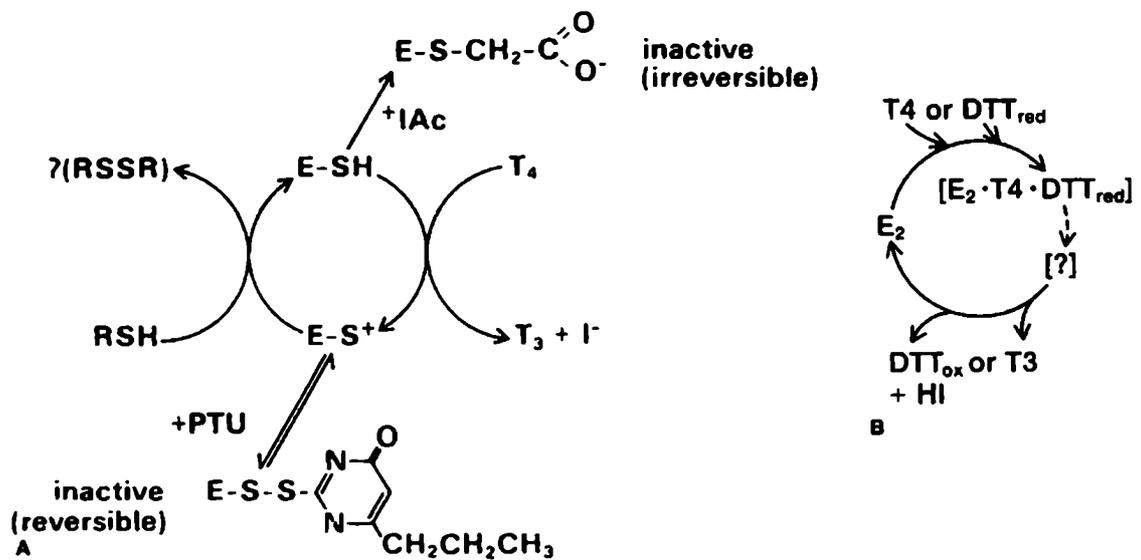


Figura 11. Esquema de inhibición enzimática por PTU

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

La importancia relevante del hígado en el metabolismo enzimático de sustancias biológicas y xenobióticos ha sido ampliamente reconocido. En la década de 1950 se encontró que los hidrocarburos policíclicos tenían un potencial inductor o que incrementaban la actividad metabólica de varios de estos sistemas enzimáticos (Conney y col., 1965). La inducción de enzimas hepáticas por una droga, puede metabolizar otras sustancias además de la misma. Con la demostrada importancia del hígado en el metabolismo de hormonas tiroideas, no es sorprendente que un número de sustancias químicas sintéticas afecten indirectamente la función tiroidea por aumentar el metabolismo de iodotironinas.

MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE HORMONAS TIROIDEAS

La acción de las hormonas tiroideas (HT) puede clasificarse en: **acciones genómicas** (actuando a nivel nuclear) y **acciones no genómicas** (actuando en la membrana celular y a nivel mitocondrial). Los efectos genómicos son todos los que implican la interacción entre la hormona y su receptor, mientras que los no genómicos no implican interacción con el receptor.

Acciones genómicas: El receptor de hormonas tiroideas (RHT) es un factor de transcripción de localización nuclear que pertenece a la superfamilia c-erb A, relacionado con los protooncogenes que codifican para factores activadores de la transcripción modulados por ligando. Se expresan 2 tipos: TR α y TR β , cuyos genes codificantes están localizados respectivamente en los cromosomas humanos 17 y 3. El procesamiento alternativo de los transcritos primarios dan lugar a 2 isoformas para cada uno: TR α_1 , TR α_2 y TR β_1 y TR β_2 que difieren

únicamente en el extremo amino terminal. El receptor posee tres dominios: uno de reconocimiento de la hormona, otro de unión al ADN y un tercer dominio hipervariable (**Figura 12**). La secuencia que contiene los dedos de Zn, común a toda la familia, provee especificidad para la unión a las regiones del ADN de los genes regulados por estas hormonas, que se denomina elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE). Se trata de una secuencia hexamérica que se repite en diversos sitios del promotor del gen. El complejo hormona-receptor forma dímeros que pueden ser homo o heterodímeros (según estén compuestos por dos receptores del mismo subtipo o no) que se unen al TRE en el ADN y como consecuencia de esta unión ocurre una alteración en la transcripción que dependiendo de que gen se trate será aumentada o reprimida.

El receptor de T₃ se puede unir al ADN tanto en presencia como en ausencia de la hormona. Cuando la T₃ no se encuentra unida al receptor, este se une a TREs positivos y producen la inhibición (reprimen) de la transcripción. Cuando la T₃ se une al receptor se produce la desrepresión, aumentando la actividad de transcripción. Para producir la represión óptima se requiere además de la participación de una serie de proteínas, denominadas corepresores.

Por otro lado, la unión de T₃ al receptor no solo desreprime la inhibición producida por la presencia del receptor solo, sino que también aumenta la actividad transcripcional por encima de los valores basales. Esta acción requiere de la participación de proteínas, denominadas coactivadores. Estas proteínas se unen al extremo COOH del receptor de T₃.

Estudios recientes han demostrado que, si bien el complejo hormona-receptor es capaz por sí mismo de modular la transcripción existen ciertas proteínas localizadas en el núcleo que potencian estos efectos. Se las ha denominado proteínas auxiliares del receptor de las hormonas tiroideas, en inglés " Thyroid hormone receptor auxiliary protein" , TRAP).

En general los receptores α están relacionados con funciones estimuladoras mientras que los β con funciones inhibitorias. El TR β_2 es el responsable de la inhibición ejercida sobre el eje, se expresa sólo en hipotálamo e hipófisis y no

puede ser reemplazado en su función por TR β_1 , que se expresa en todos los tejidos. (Messier y col, 2001).

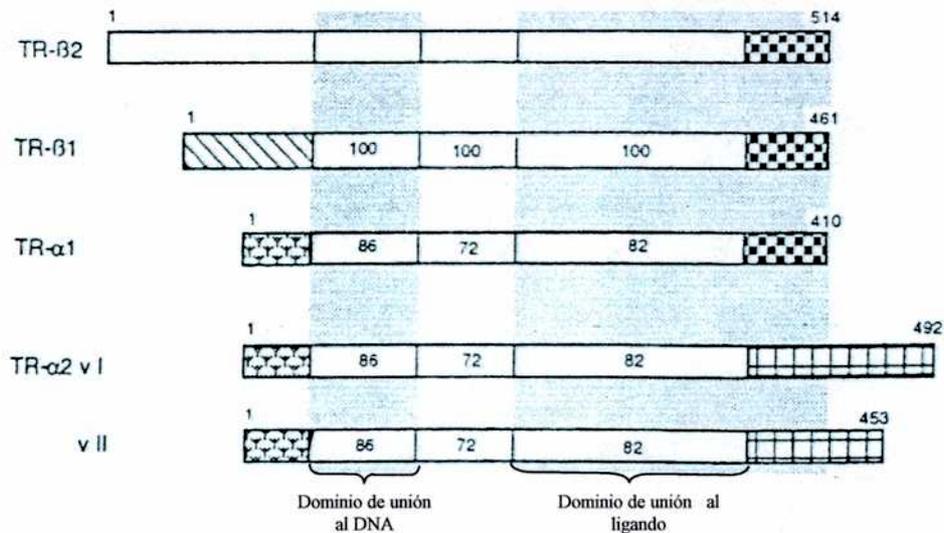


Figura 12: Estructura de los receptores de hormonas tiroideas. Los números dentro de los dominios representan el grado de homología con la secuencia aminoacídica de TR-β₂.

Acciones no genómicas: Entre los efectos ejercidos a nivel no genómico se pueden citar algunos efectos sobre la membrana citoplasmática (estimulación de la captación de glucosa en diversos tejidos; aumento en la cantidad de receptores β₂ adrenérgicos en el músculo cardíaco); sobre el retículo endoplasmático (modulación de la estabilidad de algunos mensajeros); sobre el citoplasma (regulación de la disponibilidad de piruvato); sobre las mitocondrias (aumento en la respiración celular, produciendo intermediarios que son fuente de electrones).

FUNCIONES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las funciones de las HT sobre los distintos tejidos pueden clasificarse en: morfológicas, madurativas, funcionales y metabólicas.

Durante el desarrollo infantil regulan y estimulan el crecimiento óseo y neuromuscular (junto con la hormona de crecimiento) y la maduración del sistema nervioso central: determinando el número de neuronas, de dendritas y de sinapsis, junto con la mielinización.

En niños que nacen hipotiroideos, desde el nacimiento está disminuida la mielinización, por lo que también se encuentra disminuida la velocidad de transmisión y la actividad sináptica espontánea. La consecuencia es una disminución de la contracción muscular, dando como resultado un retraso mental (cretinismo).

En el adulto, regulan el metabolismo y gran parte de las funciones de los diferentes órganos especialmente aquellos relacionados con el crecimiento, el consumo de oxígeno y la termogénesis.

Estas hormonas también intervienen en el crecimiento ejerciendo una regulación directa sobre la expresión del gen de la hormona de crecimiento que posee una secuencia TRE, al igual que sobre la expresión de su propio receptor.

HORMONAS TIROIDEAS Y METABOLISMO

Gasto de energía: Las HT estimulan el consumo de oxígeno mitocondrial, observándose en el caso de hipotiroidismo una disminución del mismo de alrededor del 50%. En general el mecanismo por el cual regulan el consumo de oxígeno es a partir de la regulación de la actividad de la ATP sintetasa o de la traslocasa de adenina (Hafner y col., 1988 y 1990).

Las HT también intervienen en la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales, regulando así el potencial transmembrana (Brand y

col., 1992). Regulan la capacidad oxidativa de las mitocondrias actuando sobre la actividad de enzimas mitocondriales como la citocromo oxidasa y la citrato sintetasa en el hígado, riñones, corazón y músculo esquelético (lossa y col, 1991). Regulan la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, dirigiendo la salida de Na^+ y la entrada de K^+ a la célula.

Termogénesis: el tejido adiposo marrón, juega un rol central en la termogénesis. Las HT en el tejido adiposo marrón (TAM) regulan la actividad de la enzima 5'D-II, la expresion de los receptores α - β adrenérgicos y la expresión de la proteína UCP-1 (Vide infra).

Hidratos de carbono: las HT actúan sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, en algunos casos por medio de la modulación del efecto de otras hormonas, como las catecolaminas y la insulina. Las HT regulan la absorción intestinal de los carbohidratos y la magnitud del efecto glucogenolítico e hiperglucémico de la adrenalina. Provocan un aumento del número de receptores β adrenérgicos, potenciando el efecto de la adrenalina. Producen una respuesta bifásica, ya que en bajas dosis la T_4 aumenta la respuesta glucogenolítica mientras que en dosis altas incrementa la gluconeogénesis actuando sobre la piruvato carboxilasa, fosfoenol piruvato carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa. Además provocan un aumento de los transportadores de glucosa (GLUT- 3) en el cerebro. Se ha demostrado que el consumo periférico de glucosa y la gluconeogénesis hepática, se encuentran reducidos significativamente en el hipotiroidismo (Dimitriadis y col., 1997). Por el contrario la glucólisis hepática no se encuentra afectada (Gregory y col., 1995).

Lípidos: Diversos aspectos del metabolismo lipídico son regulados por las HT. En general las hormonas tiroideas afectan en mayormente la degradación lipídica que la biosíntesis. El aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, se debe tanto al efecto directo de las HT, como al aumento de la sensibilidad a los agentes

lipolíticos tales como catecolaminas, hormona de crecimiento, glucocorticoides y glucagón. Aumentan el recambio de las LDL, probablemente a través de un aumento de su degradación y del número de receptores de LDL.

En individuos con hipotiroidismo, la concentración de colesterol LDL aumenta, mientras que las concentraciones de colesterol HDL y ácidos grasos se mantienen normales (Pucci y col., 2000).

Proteínas: Las HT regulan el crecimiento y el desarrollo a partir de su control sobre la transcripción del ADN, la traducción del ARNm y las modificaciones post-traduccionales.

Está demostrado que en el hipotiroidismo se reduce tanto la síntesis como la degradación de las proteínas (Carr y col., 1983), siendo más importante el efecto sobre la degradación.

Algunas de las proteínas más importantes afectadas en su expresión por las HT son la lipoproteína lipasa hepática, las globulinas de unión a hormonas sexuales, el factor VIII de coagulación y la enzima convertidora de angiotensina. La síntesis de algunos proteolípidos y proteínas en el sistema nervioso de los neonatos hipotiroideos está reducida al igual que la síntesis de cartílago, factores de crecimiento, etc. (LaFranchi, 1999).

TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

En los últimos años se ha demostrado que el tejido adiposo juega un importante rol como órgano endocrino, regulador del metabolismo de la glucosa y de la homeostasis energética (Li y col., 2002).

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM) los cuales intervienen de diferente manera en el mantenimiento, distribución y almacenamiento de las reservas metabólicas de energía.

Se puede describir a ambos tejidos adiposos como una asociación laxa de células vascularizadas repletas de lípidos (adipocitos), incluidas en una matriz de fibras de colágeno. Las vacuolas lipídicas pueden presentarse en dos formas: unilocular o multilocular. El primer fenotipo es característico del TAB y la principal función de este tejido es la reserva de energía en los mamíferos.

El segundo fenotipo es característico del TAM y las principales funciones de este tejido son la producción de calor, mediante un mecanismo denominado termogénesis facultativa, y el balance energético. Estudios recientes de laboratorio han demostrado la existencia de una capacidad de plasticidad del tejido adiposo que le permite bajo determinadas condiciones fisiológicas (obesidad, diabetes, etc), diferenciarse o transdiferenciarse a tejido adiposo blanco o marrón (Cinti y col., 2002).

El tejido adiposo marrón ha sido hallado en los mamíferos recién nacidos de casi todas las especies estudiadas. Aparece durante la vida embrionaria en lugares específicos y ninguna localización nueva se genera después del nacimiento. En los mamíferos no hibernantes el peso relativo de este tejido declina durante la maduración. No obstante en la rata puede aumentar nuevamente por exposición prolongada al frío. En la rata adulta, el TAM se localiza principalmente en la región interescapular y en las axilas, existiendo además algunos depósitos menores adyacentes al timo y a la región media dorsal del tórax y del abdomen. En el

humano adulto hay escasos depósitos de tejido adiposo marrón, pero en el feto y en el recién nacido existe un tejido muy semejante al de los roedores, en cuanto a su morfología y función. La ubicación de estos depósitos en el ser humano está descrita en las regiones cervical posterior, axilar, suprailíaca y perirrenal, y con menor densidad en las zonas interescapular, mediastínica anterior, intercostal, abdominal anterior y retropubiana.

El TAM varía de color desde el moreno hasta un pardo rojizo fuerte. Su color se atribuye a la alta concentración de citocromos que contienen sus numerosas mitocondrias. Posee gran cantidad de estructuras de Golgi, pero el retículo endoplasmático rugoso y los depósitos de glucógeno son escasos.

El TAM se caracteriza por su gran capacidad de generar calor, y por su contribución a la producción de energía liberada a partir de la sobre alimentación (Trayhurn y col., 1995). Su actividad se encuentra bajo un complejo control hormonal y neural. Es un tejido altamente irrigado e innervado directamente por terminaciones nerviosas procedentes de los ganglios simpáticos medio e inferior cervicales y los cinco primeros de la cadena ganglionar torácica. Este tejido expresa tres miembros de la familia de receptores adrenérgicos β (β_1 - β_2 - β_3) y dos miembros de receptores de la familia α (α_1 , α_2) (van Liefde y col., 1992; Galitzky y col., 1993, Collins y col., 1994) los cuales vía estimulación de la adenilato ciclasa y de la proteína quinasa A o de la proteína quinasa C, desencadenan una cascada de señales que resultan en una o varias respuestas celulares.

Las terminaciones nerviosas innervan a las células adiposas y a los capilares sanguíneos próximos a ellas. Las membranas presinápticas que innervan a los vasos contienen y liberan el neuropéptido Y (NPY) (Norman y col., 1988, De Potter y col., 1997). Este neuropéptido podría tener una función importante en la regulación de la termogénesis en el TAM. Se ha demostrado que la inyección del NPY en el tercer ventrículo o en el núcleo paraventricular del hipotálamo, inhibe la actividad simpática en el TAM y disminuye la síntesis de la proteína Termogenina (UCP-1), principal responsable de la producción de calor (McCarthy y col., 1993; Egawa y col., 1991).

Este tejido también presenta terminaciones nerviosas sensoriales que liberan neurotransmisores del tipo Serotonina (5-HT) (Sullo y col., 2003), un neurotransmisor que interviene en la regulación de la actividad de la enzima deiodinante 5'D-II, presente en este tejido.

Termogénesis

Una de las características más importantes en relación a la función del TAM es la expresión de proteínas desacoplantes, UCP-1, UCP-2 y UCP-3. Las UCPs o termogeninas producen el desacople entre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones, disminuyendo el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, acelerando de este modo el proceso respiratorio celular y disminuyendo la síntesis de ATP. Esto determina una mayor degradación de carbohidratos y lípidos cuya energía producida se disipa como calor en lugar de ser almacenada como ATP.

La UCP-1 y la UCP-3, en menor medida, están relacionadas con la función termogénica del TAM (Gong y col., 1997). Experimentos de laboratorio han demostrado que ratones knock-out de UCP-1 eran sensibles al frío e incapaces de mantener su temperatura corporal (Monemdjou y col., 1999). La UCP-3 se expresa principalmente en músculo esquelético de ratas, y se la relaciona con el transporte de ácidos grasos mitocondriales y la regulación del transporte de glucosa en este tejido (Schrauwen y col., 2002).

Ricquier y col., (2002) han demostrado que la UCP-2 cubre un espectro de funciones mucho más amplio que la UCP-1. Dicha proteína además de estar relacionada con la generación de calor, se la relaciona con una función regulatoria en el metabolismo lipídico, en el músculo esquelético y en el tejido adiposo blanco, así como en la regulación metabólica y en la defensa inmunológica. Sin embargo experimentos realizados en ratones knock-out para UCP-1, demostraron que la UCP-2 no es responsable de la respuesta adaptativa termogénica en este modelo, dado que dichos animales no podían regular la temperatura corporal

aunque sobreexpresaban UCP-2 (Enerback y col., 1997). En relación a la obesidad se ha demostrado que en ratones con ingesta elevada de lípidos se sobreexpresa el gen de UCP-2 (Combatsiaris y col., 1999).

Por otro lado, existe una relación entre la expresión de esta proteína y la diabetes. Experimentos con roedores diabéticos obesos, los cuales presentan un defecto en la secreción de insulina, e hiperlipidemia, tienen sobreexpresado el RNAm de UCP-2 (Shimabukuro y col., 1997).

En los seres humanos existen estas isoformas de UCPs, donde la homología de sus secuencias varían en diferentes porcentajes. En relación a las funciones, se las relaciona básicamente con las mismas observadas en mamíferos menores. La UCP-1 está relacionada con el balance energético y la masa adiposa, (Fameron y col., 1996). Se ha demostrado la existencia de un sitio polimórfico, marcador molecular, en el gen de la UCP-1 asociado a la ganancia de peso en seres humanos (Oppert y col., 1994; Cassard-Doulcier y col., 1996). La UCP-2 por otra parte, esta relacionada con el metabolismo energético (Miller y col.,1997). Estos autores establecieron una correlación positiva entre la expresión de la UCP-2 y los individuos obesos. Hay evidencias que la UCP-3 tendría un rol fisiológico primario en el metabolismo de ácidos grasos. Se ha demostrado que una prolongada ingesta de dieta alta en grasas, aumenta la expresión del RNAm de UCP-3 en roedores y humanos (Schrauwen y col., 2003). Existen muchas variantes genéticas en el gen de UCP-3 en humanos, pero aun no se encontró una asociación significativa entre la obesidad adulta ni juvenil y la UCP-3 (Urhammer y col., 1998). Se encontró que americanos de raza negra, que tenían el RNAm de la UCP-3 con un codón exón prematuro y por lo tanto una proteína truncada, presentaban una oxidación de grasas reducida en un 50%, sugiriendo un rol de la UCP-3 en el reparto de la energía metabólica (Argyropoulos y col., 1998).

Lipogénesis

La biosíntesis de los lípidos constituye un importante proceso metabólico en la mayoría de los organismos. Debido a la limitada capacidad de los animales superiores para almacenar polisacáridos, la glucosa ingerida en exceso para sus necesidades inmediatas y para su capacidad de almacenaje, se convierte por medio de la glucólisis en piruvato, y después en Acetil-CoA, a partir del cual se sintetizan los ácidos grasos. Estos a su vez se convierten en triglicéridos, que poseen un contenido energético muy superior al de los polisacáridos, y pueden almacenarse en grandes cantidades en el tejido adiposo, también en músculo esquelético y cardíaco, para consumo local.

La mayoría de los tejidos del cuerpo pueden convertir los ácidos grasos en triglicéridos, los más importantes son: el intestino, que permite la absorción de lípidos dietarios; el hígado que participa en su uso inmediato y distribución por medio de las lipoproteínas; el tejido adiposo, donde se almacena para ser consumido a largo plazo. Existe un cuarto sitio importante de síntesis que es la glándula mamaria.

Los ácidos grasos utilizados para la esterificación del glicerol-3-fosfato pueden provenir de tres rutas metabólicas diferentes: de los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo mediante la acción de la enzima Lipasa hormono-sensible (LHS); de los triglicéridos circulantes, por la acción de la enzima lipoproteinlipasa (LPL) ubicada en el endotelio de los capilares sanguíneos y por la síntesis de novo de ácidos grasos principalmente en el TAM. La LPL es una de las principales enzimas que regulan la relación lipólisis-lipogénesis. La misma se encuentra regulada en el TAM por insulina y noradrenalina, a diferencia del TAB en el cual solo esta regulada por insulina.

La síntesis de ácidos grasos se encuentra bajo un complejo control hormonal y nutricional (Goodridge y col., 1986), siendo las enzimas claves de esta vía biosintética la Acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintetasa (AGS) (Diamaant y col., 1972; Gnoni y col., 1980).

El TAM realiza entre el 20 – 40% de la síntesis de ácidos grasos totales del cuerpo. Aún en estado no estimulado este tejido posee una actividad muy elevada de las enzimas lipogénicas, en comparación con el hígado y el TAB (Himms-Hagen y col, 1985, Blenneman y col., 1995).

La lipogénesis provee al TAM de la mayor fuente de combustible para sus abundantes mitocondrias (**Figura 13**), y es una vía metabólica de alta actividad tanto en el estado basal como durante la adaptación al frío mediante el proceso de termogénesis (Himms-Hagen, 1986). Se cree que los ácidos grasos libres desencadenan la actividad termogénica de los adipocitos marrones, aunque el mecanismo preciso de la activación aún se desconoce (Argyropoulos y col., 2002).

El primer estímulo para la termogénesis en el TAM es la norepinefrina (NE) que llega a los adipocitos marrones, vía inervación simpática y conduce a una rápida hidrólisis de los depósitos intracelulares de triglicéridos (Cannon and Nedergaard, 1985).

Como posibles precursores de la síntesis de ácidos grasos en el TAM se encuentran: la glucosa (McCormack y col., 1982), cuerpos cetónicos (Agius y Williamson, 1981) y para algunos autores, la Acetil-CoA (Kawashita et al., 2001). Contrariamente, otros autores demostraron que la glucosa es un pobre sustrato para la síntesis de ácidos grasos en este tejido adiposo (Brito y col., 1999).

A diferencia del TAB, en el TAM de los mamíferos en desarrollo y maduros, hay una escasa o nula movilización de triglicéridos en respuesta a la restricción dietaria y un insignificante aumento en la acumulación de triglicéridos en respuesta a la sobre alimentación. Por el contrario las reservas almacenadas en

este tejido responden en gran medida a la crioestimulación (Carvalho y col., 1993).

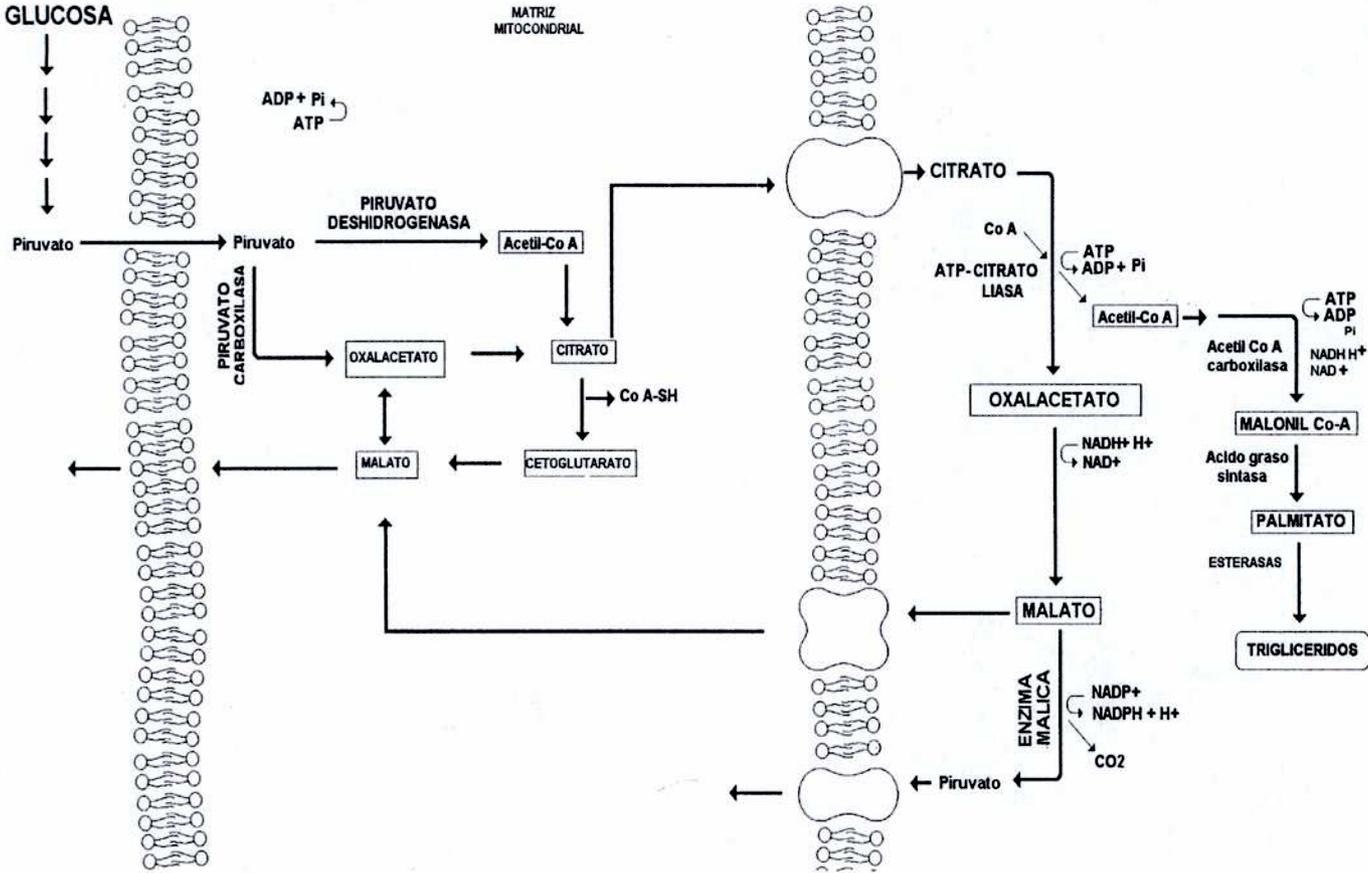


Figura 13. Esquema de la síntesis de ácidos grasos

Esta demostrado que en el TAM, la insulina incrementa la síntesis de ácidos grasos (McCormack y col., 1982) así como la noradrenalina la inhibe (Buckley y Rath, 1987).

Otro factor regulatorio de la síntesis de estos compuestos son las hormonas tiroideas, las que juegan un papel variable de acuerdo al tejido blanco donde actúan, siendo su acción tejido específica. Por ejemplo es sabido que la síntesis de ácidos grasos en el hígado es altamente respondiente al status hormonal tiroideo (Freake y col., 1989). En el TAM, la lipogénesis es estimulada en un estado hipotiroideo (Freake y Oppenheimer, 1987; Blenneman y col., 1992, Bianco y col., 1998). Bahtt y Saggerson (1988) sugirieron que en estado hipotiroideo, se produce un incremento en la utilización de glucosa para la síntesis de ácidos grasos en el TAM.

Transporte de glucosa

El transporte de glucosa y la captación de ácidos grasos controlan la velocidad de los procesos de utilización de energía en muchos tejidos. El transporte de glucosa regula asimismo, la producción y liberación de insulina en el páncreas; y el metabolismo de la glucosa, glucógeno y la síntesis de ácidos grasos en el hígado. Los transportadores de glucosa presentan diferentes isoformas las cuales se expresan en diferentes etapas del desarrollo del organismo y en diferentes tejidos. Los GLUT-1 son las isoformas constitutivas del transportador de glucosa en ratas, mientras que en el TAM la isoforma del transportador de glucosa que se expresa en estado adulto en un 95%, es GLUT-4 (Kandror, 2003). Las hormonas que regulan el GLUT-4 en este tejido, con respecto a su afinidad o expresión, son la insulina y la noradrenalina (Shimizu y col., 1998).

En el hígado, el transportador mas expresado es la isoforma GLUT-2, que se expresa en adultos normales, aunque también se expresa en otros órganos tales como riñón, intestino delgado y células beta del páncreas.

Regulación hormonal

A nivel hormonal el TAM expresa receptores para insulina, glucagón, glucocorticoides y hormonas tiroideas. También presentan receptores para ácido retinoico y como ya se menciona anteriormente, para noradrenalina.

El principal factor regulatorio son las hormonas tiroideas, las que presentan un sinergismo junto con el sistema nervioso sobre la inducción de la UCP-1 y la 5' D-II responsable de la deiodinación de la tiroxina en el TAM (Leonard y col., 1983; Silva y col., 1986; St Germain y col., 1985). En el TAM, al igual que en cerebro se necesita ocupar entre el 75-85% de los receptores nucleares de T_3 para obtener la respuesta biológica óptima.

Asimismo las hormonas tiroideas regulan la actividad de enzimas lipogénicas en este tejido, tales como la enzima málica y la Glucosa 6-P-deshidrogenasa (Alvarez y col., 1999). Por medio de un control hipotalámico, la NE rápidamente estimula a la D-II, generando un aumento significativo en la concentración de T_3 tisular, llegando a un estado de hipertiroidismo local (Roland y col., 2003).

Esta T_3 extra es generada en forma local por la 5' D-II, derivada de la T_4 plasmática. Como consecuencia de esta deiodinación intracelular, el TAM puede regular la ocupación de los receptores nucleares de T_3 de manera independiente de los niveles de T_3 plasmáticos. De este modo la regulación local que se ejerce sobre la 5' D-II es crítica en determinados estados tiroideos (Roland y col., 2003).

La T_3 es una hormona que mantiene sus niveles séricos constantes a lo largo del día. No es considerada una hormona que responda en forma aguda a las fluctuaciones o perturbaciones metabólicas, por lo tanto un incremento transitorio en las concentraciones tisulares de la misma no tiene por que reflejarse en un impacto a nivel sérico.

Esta demostrado que la actividad de la 5' D-II esta regulada por mecanismos pre y post-transcripcionales y que estos mecanismos dependen del tejido donde se expresa dicha enzima (Sn Germain y col., 1994).

La enzima 5' D-II de TAM posee una vida media corta, 45 minutos, en comparación con la de 5' D-I (12 hs). Se ha demostrado que la corta vida media de D-II es debido a la ubiquitinación de la misma y su posterior degradación proteosomal (Gereben y col., 2000). También puede ocurrir que luego de la ubiquitinación la 5' D-II ubiquitinada se reactive por deubiquitinación, siendo este un mecanismo para aumentar la vida media de la enzima (Cursio-Molleri y col., 2003).

RESULTADOS PREVIOS DE NUESTRO LABORATORIO RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS

Se ha descrito en nuestro laboratorio (Kleiman de Pisarev y col., 1989,1990) que el tratamiento crónico de ratas hembras con HCB, producía una disminución de los niveles circulantes de T_4 total y T_4 libre y un aumento en los niveles de TSH, sin afectar los niveles de T_3 . La relación entre la síntesis de T_4 y T_3 no estaba afectada por el HCB (Kleiman y col., 1990). En experimentos in vivo demostramos que el HCB aumentaba la deiodinación y excreción fecal de T_4 , sin cambios importantes en el metabolismo periférico de T_3 (Kleiman de Pisarev y col., 1989). En las mismas condiciones experimentales, el HCB inducía la actividad de las enzimas lipogénicas hormono-tiroideas dependientes, enzima málica (EM), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa (6PGD) en hígado, sin alterar la actividad de la L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (LG3PD). Este efecto del HCB dependía de la presencia de hormonas tiroideas (Kleiman y col., 1995). Asimismo demostramos que el HCB aumentaba la expresión del ARNm de la enzima málica, modulando los niveles de proteínas nucleares, aún no identificadas, que se unen al TRE del sitio promotor de la enzima málica (Loaiza y col., 1999).

Por el contrario en el TAM el HCB disminuía tanto la actividad de las enzimas citosólicas productoras de NADPH, EM y G6PD, como la de la enzima mitocondrial LG3PD en forma dependiente de la dosis y del tiempo (Alvarez y col., 1999). Nuestros estudios en ratas tiroidectomizadas demostraron que el efecto inhibitorio del HCB sobre la actividad de las enzimas EM, G6PD y LGPD era independiente del estado tiroideo.

Contrariamente a lo observado en hígado, en TAM, el hipotiroidismo inducido por tiroidectomía, aumentaba la actividad basal de las EM y G6PD, mientras que la actividad de la LG3PD disminuía en la forma esperada, indicando que en este tejido las enzimas lipogénicas estarían sujetas a un complejo control hormonal.

Se ha sugerido que el aumento en la actividad de ambas enzimas podría deberse a la disminución en la secreción de la hormona de crecimiento (GH), inducida por el estado de hipotiroidismo, la que ejercería una regulación negativa sobre la actividad de las enzimas lipogénicas (Carvalho y col., 1993).

En relación al metabolismo lipídico estudios histológicos previos de nuestro laboratorio mostraron que en ratas tratadas con HCB se observaba una marcada hipertrofia celular en el TAM, acompañada de un gran número de gotas lipídicas que se podrían correlacionar con una mayor actividad metabólica celular, en este caso de acumulación de triglicéridos (Alvarez, 1997). No se conoce aún el mecanismo que conduce a estas alteraciones morfológicas.

OBJETIVOS

En base a los antecedentes ya expuestos nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Evaluar la contribución de los diferentes tejidos para el mantenimiento de la homeostasis de las hormonas tiroideas en ratas intoxicadas con HCB.

2- Dado que en el TAM el principal factor regulador son las hormonas tiroideas y además de ser el principal sitio de acumulación del HCB, observamos alteraciones en el metabolismo lipídico del mismo en ratas intoxicadas, nos propusimos investigar alteraciones en parámetros funcionales del TAM, tales como la función lipogénica, termogénica y el transporte de glucosa.

HIPÓTESIS

Basados en nuestros resultados previos y en datos de la literatura, nuestras hipótesis fueron las siguientes:

1-El mantenimiento de los niveles séricos de T_3 en presencia de una marcada hipotiroxinemia en las ratas tratadas con HCB, se debería a una mayor contribución de los tejidos periféricos, mediante un aumento en la actividad de las 5' deiodinasas de los mismos. La hipotiroxinemia podría deberse a un aumento en la excreción de las hormonas tiroideas por la acción de la UDP-glucuronil transferasa de T_4 .

2- La acumulación de gotas lipídicas observadas en el TAM por estudios histológicos de ratas intoxicadas con HCB, podría deberse a varias razones:

a-un aumento en el ingreso de ácidos grasos y glucosa

b-un aumento en la actividad de enzimas claves del camino biosintético de los ácidos grasos.

MATERIALES Y

METODOS

Protocolo Experimental

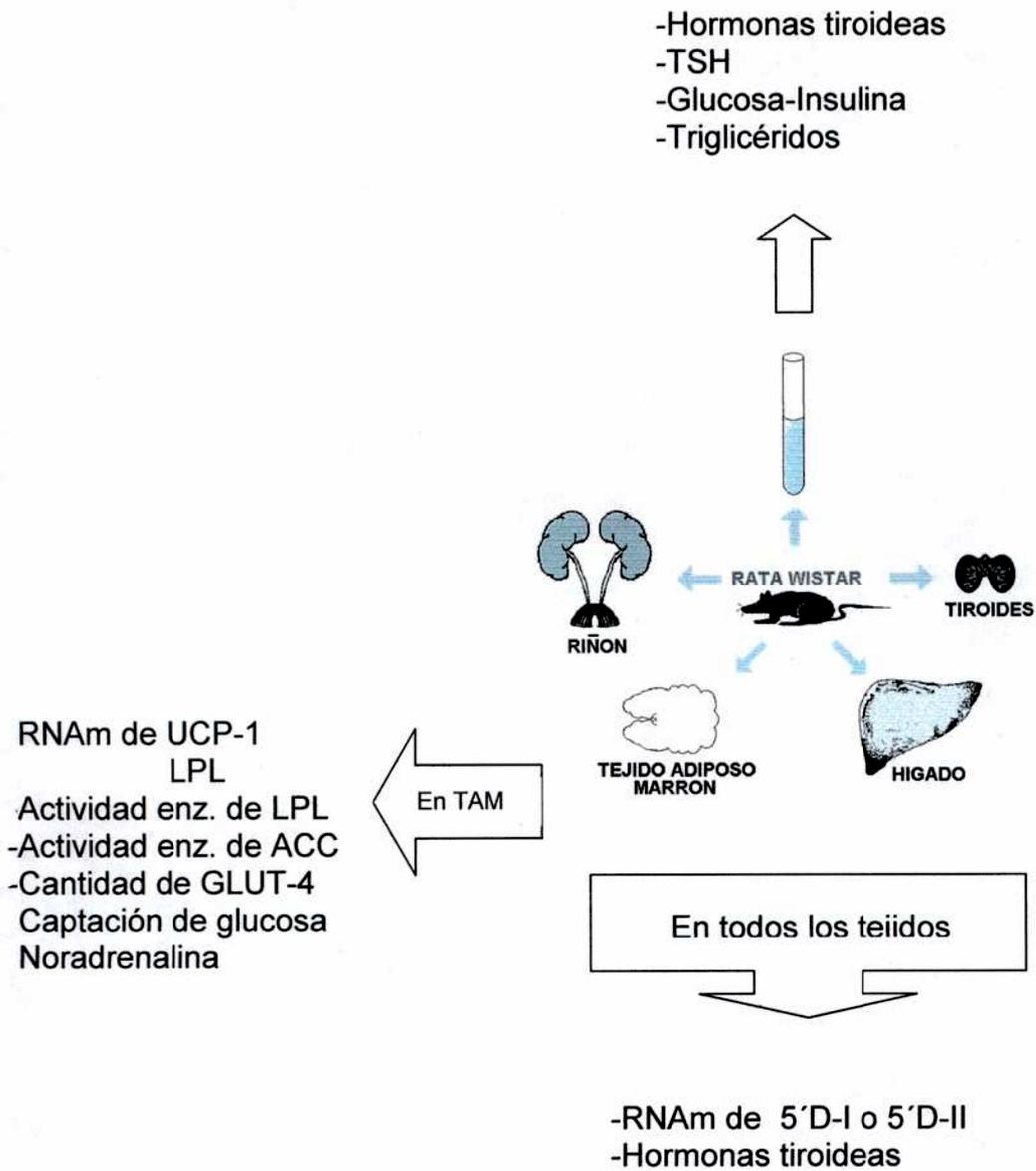


Figura 14. Esquema del protocolo experimental

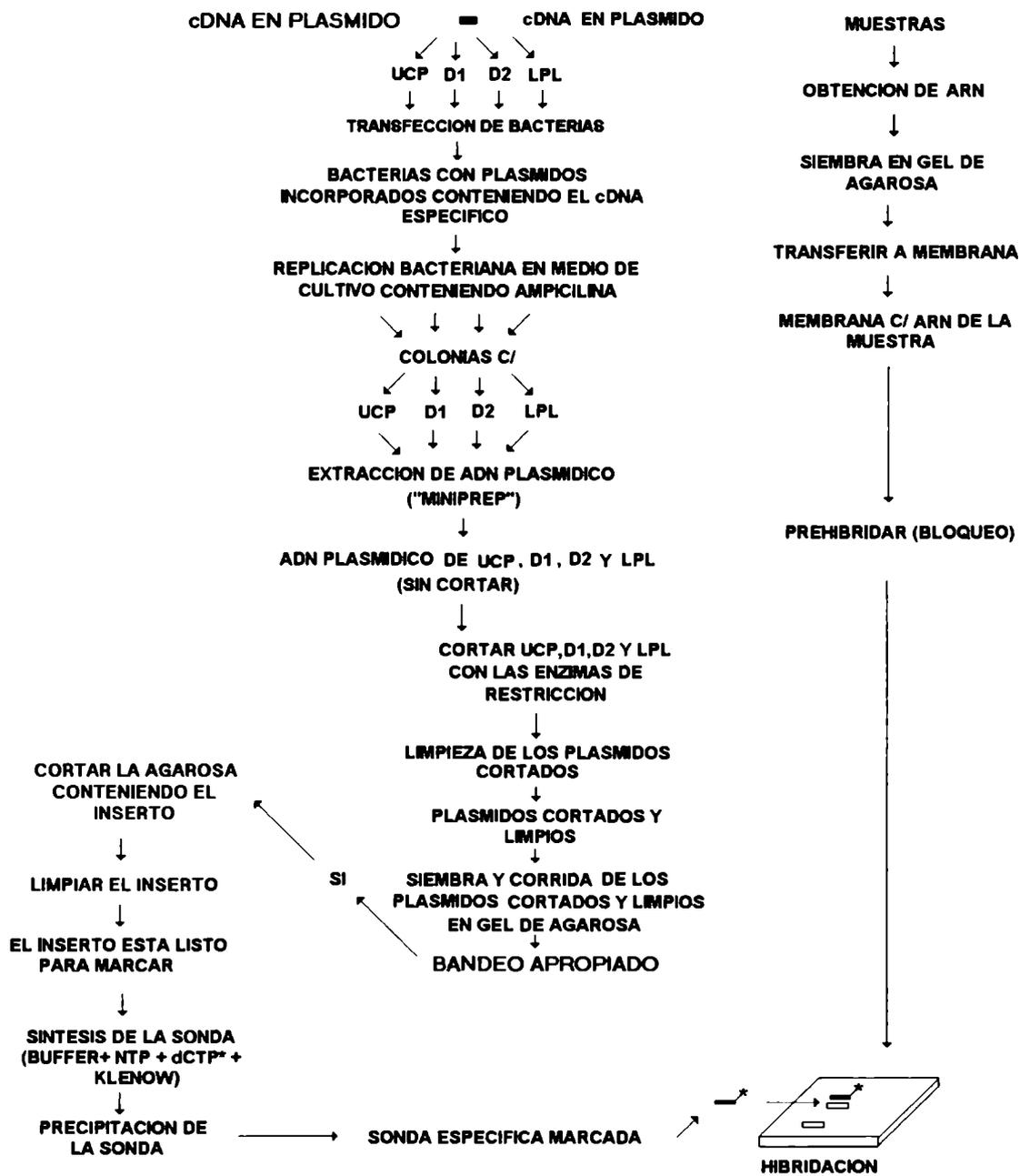


Figura 15 Esquema del protocolo molecular

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos de 140-160 g de peso al inicio del tratamiento, de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Fueron alimentadas con alimento balanceado Rata-Ratón (Corporación S. A.) y agua *ad libitum*. Las condiciones ambientales del bioterio consistieron en ciclos de 12 hs luz-12 hs oscuridad, $22-24 \pm 2$ °C de temperatura y 65-75% de humedad. Luego de un período de aclimatación de 7 días, se comenzaron los distintos tratamientos.

La salud general de los animales, evaluada por el comportamiento y apariencia de las ratas, examen de epidermis, membranas mucosas, peso corporal y consumo de agua y alimento, no fue afectada por los diferentes tratamientos empleados.

MATERIALES

Se les suministro a los animales Hexaclorobenceno (HCB, >99% de pureza, grado comercial), el cual fue obtenido de Máximo Paz S. A. (Bs. As., Argentina).

Los reactivos químicos de calidad analítica utilizados fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Los kits para purificación y síntesis de sondas de DNA, las enzimas de restricción y los marcadores de peso molecular de DNA fueron comprados en Promega S. A. (Madison, WI).

El reactivo TRIZOL para la extracción del RNA total de los tejidos fue comprado en Invitrogen Life Technologies, producer of Gibco BRL, (Gaithersburg, MD).

El ^{32}P -dCTP(100 μCi) para la marcación de las sondas, así como la ^{125}I -3,5,3'triiodotironina y la L-[^{125}I]-tiroxina, utilizadas para el ensayo de glucuronidación y los ensayos de deiodasas, y el H^{14}CO_3 utilizado para el ensayo de la actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa, fueron comprados a Amersham International (Aylesbury, UK)

La ^3H 2-deoxiglucosa- (^3H -2DOG), utilizada para medir la actividad de los transportadores de glucosa en el TAM y en el TAB, fue adquirida en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

La ^3H -trioleína utilizada como sustrato radioactivo para medir la actividad de la enzima lipoprotein-lipasa del TAM, y el medio de cultivo Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM), así como el Krebs-Ringer-Heppes fueron comprados en Gibco (Grand Island, NY).

Las membranas de Nylon utilizadas en los Northern Blot fueron compradas a Amersham Radiochemical (Arlington Heights, IL); las membranas de nitrocelulosa, así como las de acrilamida, a BIO-RAD (Richmond, CA).

Tratamiento de animales

Las ratas recibieron HCB (1000mg/kg p.c.) diariamente por intubación gástrica, durante 30 días. La dosis empleada fue elegida sobre la base de estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Kleiman de Pisarev y col., 1989, 1990) que demostraron que dicha dosis desencadenaba claras manifestaciones de porfiria hepática y alteraciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas.

El fungicida fue resuspendido en agua conteniendo Tween 20 (0,5ml/100ml). Los animales controles fueron tratados con el vehículo por el mismo periodo de tiempo. Luego del tratamiento, se sacrificaron las ratas por decapitación.

Con el objeto de evaluar el efecto del HCB sobre la actividad estimulada del TAM, se realizaron una serie de experimentos en condiciones de exposición aguda al frío (4 C). En dichos experimentos se evaluó la actividad y RNAm de la enzima 5 D II, así como el RNAm de la proteína UCP-1, y las concentraciones tisulares de las HT. Para poder integrar estos efectos y evaluarlos sobre la fisiología y homeostasis general de la rata, también se estudio la actividad de las enzimas deiodinantes en frío en hígado, riñón y tiroides, así como sus concentraciones tiroideas.

Cepa bacteriana

Se utilizo la cepa de bacterias: DH 5 α de E. Coli. En una primera etapa se hicieron competentes a dichas bacterias y luego se las transformaron con los diferentes plásmidos. Alícuotas de ambas instancias fueron almacenadas en el freezer a -70°C, bajo condiciones adecuadas.

Plásmidos utilizados

a- pTZ19, contiene el inserto de cDNA total para el gen de la UCP-1 de rata, entre los sitios de corte para la enzima de restricción ECO-RI. El tamaño del plásmido es de 2,9 Kb y el del inserto es de 1,2 Kb.

b- pGEM2, contiene el inserto de cDNA total para el gen de la LPL de rata, entre los sitios de corte para la enzima de restricción ECO-RI. El tamaño del plásmido es de 2,8 Kb y el del inserto es de 1,48 Kb.

c- pBS.KS, contiene el inserto de cDNA total para el gen de la D1 de rata, entre los sitios de corte para la enzima de restricción Xho y Not. El tamaño del plásmido es de 4,39 Kb y el del inserto es de 2,1 Kb.

d- pBS.KS, contiene el inserto de cDNA total para el gen de la D2 de rata, entre los sitios de corte para la enzima de restricción Eco RI El tamaño del plásmido es de 4,39 Kb y el del inserto es de 1,4 Kb.

e- El inserto de cDNA total para el gen de la ciclofilina esta incluido en un plásmido donado por la Dra. M.J.Obregón, (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid España), que se utilizó completo en el ensayo de Northern Blot.

Medio de cultivo

Como medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias utilizamos LB, el cual contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 ml de 1 M de NaOH- por litro. En el caso del medio de cultivo sólido para plaquear y realizar los sucesivos repiques se utilizó el mismo medio con el agregado de agar (2g/ 100ml) Una vez volcado el medio a solidificar en las cápsulas de petri se le agrego el antibiótico y se incubaron las mismas invertidas en estufa a 37 °C (12-16hs). Luego se las mantuvo en cámara fría.

Competencia de bacterias

Se tomó una punta de espátula de las bacterias DH 5 α y se las hicieron crecer en 10 ml de LB. Luego de la incubación a 37°C se tomaron 100 μ l del medio con las bacterias y se llevó a un volumen de 10 ml con LB estéril. Se los incubó a 37 °C durante 2-4hs. Luego se centrifugó a 2.988 x g a 4 °C y al pellet se lo resuspendió

en 5 ml de CaCl₂ 50 mM y se lo incubó 30 min a 4°C. Se centrifugo en las mismas condiciones que antes, y el pellet fué resuspendido en 1ml de CaCl₂ 50 mM, obteniendo así las bacterias competentes, las cuales se dejaron en cámara fría por 24 hs y luego se las transformó o se congelaron a -20 °C.

Transformación de bacterias

A 100µl de bacterias competentes (preferentemente inmersas en hielo seco), se les agregó entre 20-40ng de DNA y se las dejaron en hielo durante 30 min. Luego se las incubó durante 2 min. a 42 °C (con agitación), y posteriormente se los dejó 2 min en hielo. Se le adicionan 300µl de LB sin antibiótico y se lo incubó durante 60 min con ampicilina. Pasado ese período se plaqueó en agar con antibiótico, incubándose en forma invertida en estufa a 37 °C. Las bacterias transformadas fueron guardadas en heladera.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Extracción de RNA total

La extracción del RNA total de los tejidos se llevo a cabo con el reactivo TRIZOL, según el método de Chomzinsky (1987). El precipitado final de RNA, en cualquiera de los casos, fue resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1%, como inhibidor de RNAsas. La concentración fue valorada por lectura de la absorbancia de una alícuota a 260 nm.

Separación de RNA por tamaños

Se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído 2,2M, para asegurar la plena desnaturalización de los RNAs. Se aplicaron 40 µg de RNA total, en el caso del hígado y el riñón, y 20 µg en el caso del TAM y de la tiroides,. La electroforesis se llevo a cabo a 80 V durante 3 hs. La tinción con Bromuro de Etidio de estos geles reveló los 2 RNAs ribosomales 28S y 18S mostrando las posibles diferencias en la cantidad de RNA sembrado entre los pocillos.

Transferencias de RNA a membranas de Nylon

La transferencia de los RNA totales a las membranas de Nylon se realizó por Northern-Blot (Maniatis y col., 1982). Posteriormente las membranas fueron teñidas con azul de bromofenol y secadas en estufa a 80°C durante dos horas, para la fijación del RNA.

Marcación de las sondas

Con todos los plásmidos se siguió el siguiente procedimiento: Las bacterias (E. Coli DH 5 se hicieron competentes por el protocolo descrito previamente en Maniatis y col., (1982). Luego fueron transformadas con los diferentes plasmidos que contenían los insertos y un gen que codifica para ampicilina. Se amplificaron los plásmidos por medio del crecimiento bacteriano en un medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 ml de 1 M de NaOH- por litro) con antibiótico apto para E. Coli transformada. Las bacterias se lisaron en solución alcalina y se separó el DNA bacteriano del plasmidico, utilizando un kit para

purificación de DNA de Promega. Una vez purificado el plásmido se obtuvo el inserto por digestión con enzimas de restricción correspondientes.

Para la limpieza de los insertos, se sembró en un gel de agarosa al 1,5% el producto de la digestión enzimática teñido con bromuro de etidio, los marcadores de peso molecular de DNA de 1 Kb, y una alícuota de DNA plasmídico sin cortar. Se los corrió a 80 V durante 2 hs y se obtuvo como resultado la separación diferencial del DNA plasmídico en sus tres posibles conformaciones, el inserto y el DNA degradado.

Se cortó la agarosa en la zona del gel donde se visualizó por su peso molecular, el gen del inserto y luego se lo separó de la agarosa con el producto Gene Clean (BIO 101) (Bio-Rad).

Los insertos se marcaron con α ^{32}P -dCTP (100 μCi /sonda), utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y siguiendo las condiciones recomendadas en el "Kit of Labeling System" de Promega. Se obtuvo en todos los casos una actividad específica de 1,5-2 X 10⁹ cpm/ μg aproximadamente.

Los insertos marcados se purificaron por cromatografía a través de una columna Nick TM de Sephadex G-50 de Pharmacia siguiendo el protocolo sugerido por los fabricantes.

Hibridación

Las membranas se prehibridaron durante 24 hs con 10 ml de una mezcla que contenía 50% de formamida, Denhardt 5%, SSC 5X, 0,1% de SDS y 300 μg de esperma de salmón. Inmediatamente después las membranas se hibridaron con 5 ml de la solución de hibridación (50% de formamida, Denhardt 2%, SSC 6X, 0,1% de SDS y 300 μg de esperma de salmón, conteniendo aproximadamente 1-2 X 10⁶ cpm/ml de la sonda marcada. Para eliminar la radioactividad inespecífica de las membranas, se procedió a una serie de lavados en los que se fue disminuyendo progresivamente la concentración de sales hasta 2X de SSC y aumentando la de detergente hasta 1% de SDS. Al mismo tiempo la temperatura se elevó

progresivamente hasta 50°C en el caso de todas las sondas salvo la de UCP-1 que se elevó hasta 65°C.

Autorradiografías y cuantificación

Las autorradiografías se realizaron por exposición de las membranas que contenían los RNAm hibridados, por diferentes períodos de tiempo (2 a 10 días según la sonda, con películas Kodak X-Omat o Valca (de menor sensibilidad). La cuantificación densitométrica permitió analizar las diferencias en los niveles de mRNA específicos en cada grupo. Para corregir las diferencias cuantitativas en el RNA total sembrado se utilizaron 2 métodos: tinción de las membranas con azul de metileno, o rehibridización con una sonda de ciclofilina marcada con α ^{32}P -dCTP. Luego se estableció una relación entre la cuantificación de la sonda específica y la cuantificación de su control de carga específico (ribosomal o ciclofilina), expresando los resultados ya normalizados.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS

Determinación de la actividad de las enzimas 5' Deiodinasa Tipo I y II

La ^{125}I - 3,5,3'triiodotironina, actividad específica (1200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), concentración 320 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, y la L- ^{125}I -Tiroxina (1200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), utilizados en el ensayos de deiodinasas, fueron suministradas por New England Nuclear.

La actividad de la enzima 5' D-II fue ensayada en homogenato de TAM (Obregón y col., 1989) utilizando ^{125}I T₄ (60,000 cpm/tubo) en presencia de 2 nM T₄ , 1 μM T₃, y 20 mM dithiothreitol (DTT) en 100 mM buffer de fosfato de potasio (pH 7,0), en presencia (5'D-II) o ausencia (5' D_{total}) de 1 mM 6-propyl-2-thiouracil (PTU). Se

incluyó en la reacción T_3 (1 mM) para prevenir la deiodinación del anillo interno por la acción de la 5D.

En Hígado, Riñón y tiroides se midió la actividad de la enzima 5' D-I utilizando $[^{125}I]rT_3$ (60,000 cpm/tubo) en presencia de 400 nM rT_3 para hígado y riñón, y 800 nM rT_3 para tiroides, en ambos casos se le adicionó 2 mM de DTT. La reacción se llevo a cabo a 37 °C por 10 min para hígado, riñón y tiroides, para el TAM el tiempo de incubación fue de 60 min. Antes de cada ensayo se realizo una purificación de los sustratos para eliminar la posible contaminación con Ioduro, por medio de electroforesis en papel.

Una vez transcurrida la reacción, el ^{125}I liberado fue separado por cromatografía de intercambio iónico sobre columnas de Dowex-50W-X2 (BioRad, Richmond, CA) equilibradas con ácido acético al 10% (Leonard y Rosenberg, 1980), anteriormente se confirmo que el $^{125}I^-$ y la $[^{125}I] 3,3'-T_2$ fueron producidas en cantidades iguales. La cantidad de proteína utilizada fue de 75-150 $\mu\text{g.vial}^{-1} \cdot 100\mu\text{l}^{-1}$ en la mezcla de incubación. La cuantificación de las proteínas se realizaron por el método descrito anteriormente (Lowry y col., 1951) después de la precipitación de el homogenato con tricloro acético (TCA) para evitar la interferencia del DTT en la reacción colorimetrica.

Determinación de la actividad de la enzima UDPGT para T_4 y T_3

Los hígados fueron perfundidos con solución salina y homogeneizados en 1: 3 vol. de 50 mM Tris, 150 mM KCl (pH 7,4) a 4° C. Se obtuvieron los microsomas por centrifugación durante 20 min a 900 x g y subsecuente centrifugación del sobrenadante por 60 min at 100,000 x g. El pellet microsomal fue resuspendido en 1 ml de buffer de homogenato y freezado a -80° C. Las proteínas se midieron por el método de bradford (1976), utilizando BSA como standart. La actividad de la UDPGT de T_3 y de T_4 se realizó incubando 75 μM T_4 o T_3 y 1 μCi $[^{125}I]-T_4$ o $[^{125}I]-T_3$ 0,1 μCi , durante 60 min a 37° C con presencia o ausencia (blanco) de 5 mM

ácido UDPglucurónico (UDPGA) en 66 mM Tris-HCl (pH 7,8), 100 mM MgCl₂ y 0,025 % Brij 56 (Volumen final: 200 µl). Se comenzó la reacción con el agregado de los microsomas (0,5 mg) resuspendidos en sacarosa 0,25 M. La reacción se detuvo por el agregado de igual volumen (200 µl) de metanol frío y posterior centrifugación. Una alícuota de 200µl del sobrenadante fueron mezcladas con 800µl 0,3 M HCl / 10% v/v de etanol. Se analizó la formación de glucuronidos de la mezcla por medio de columnas de cromatografías de Sephadex LH-20 (Beetstra y col., 1991).

Los solventes utilizados para lograr la elusión diferencial de los productos fueron: HCl 0,3 M-etanol 10%v/v ; HCl 0,1 M; etanol-agua 20% v/v; NH₄ 0,1 M-etanol. El I- se eluyó con el segundo solvente, mientras que con el tercer solvente se eluyó la fracción de T₄-glucuronidada y con el último, la T₄ libre.

Determinación de la actividad de la Acetil CoA Carboxilasa

El ensayo de la Acetil CoA Carboxilasa (ACC), se realizó según el método de Witters (1979). Se homogeneizó el TAM en 3 volúmenes de Sacarosa 0,25 M pH-7,5, se lo centrifugó a 100.000 g por 45 min a 4° C y se obtuvo un infranadante el cual se utilizó para incubar en la mezcla de la reacción. La misma contenía Tris-HCl (60 mM, pH: 7,5); ATP 2,1 mM; MgCl₂ (5mM; Acetil CoA (0,15 mM); 2 Mercaptoetanol (1,2 mM); y BSA (1mg/ml); Na₂H ¹⁴CO₃ 18 mM (actividad específica 0,5 µCi / mmol y citrato de Na 5 mM. La reacción se comenzó con el agregado de 0,5 mg de proteína contenida en el infranadante a un volumen de 200 µl de mezcla de reacción, se mantuvo a 37° C durante 3 min. Se detuvo la misma con el agregado de 50 µl de perclórico 2M. Para la cuantificación del producto se tomó una alícuota de 20 µl y se lo colocó en filtros 3MM Wattman, los cuales se dejaron en desecador en cámara fría por 24 h. Luego de este periodo se los introdujo en viales con líquido de centelleo para su cuantificación.

Determinación de la actividad de la enzima Lipo-proteinlipasa

La actividad de la enzima Lipoproteinlipasa (LPL) se midió según el método de Carneheim y col., 1984. Brevemente, el tejido (50-150 mg) se colocó en 5 ml de acetona purificada y se homogeneizó en Ultraturrax durante 30 seg.. El precipitado se separó del solvente por filtración al vacío (o con jeringa) en un filtro prepesado y se llevó a 3 ml con dietileter purificado.

Los filtros se secaron al vacío a 5 °C, se pesaron y el polvo se guardó a -80°C.

La LPL se reconstituyó en buffer Tris-HCL 50mM pH 8,6 + 20 U heparina/ml poniendo 10 mg polvo/ml y agitando 45 min. a 5°C. La solución se centrifugó durante 10 min. a 12. 000 g a 5°C y se usó el sobrenadante. La concentración de proteínas era de 1,5 a 3 mg/ml.

El sustrato consistió en una solución de 1 μ mol de Tioleato de glicerol y 1 μ Ci de 3 H-Tioleato de glicerol en solución stock (0,2 M Tris-HCl, pH 8,6, 0,016 M CaCl_2 , con 2 % de goma arábica (0,1 g / 5 ml) La emulsificación se realizó en hielo, sonicando 4 veces durante 30 seg. Luego a 400 μ l de esta emulsión se la mezcló con 400 μ l de solución stock, albúmina 10% y 200 μ l de suero humano (preincubado 30 min a 37 °C). Esta mezcla se incubó 15 min. a 37 °C y se usó en el término de una hora. La actividad se determinó midiendo la liberación de oleato radiactivo a partir de tioleato de glicerol.

Captación de Glucosa

La captación de 2- 3 H deoxiglucosa (2- 3 H-DOG) se realizó según el método de Krawiec y col. (1995), según el siguiente procedimiento:

El TAM y el TAB fueron seccionados en segmentos de 100 mg de peso cada uno y colocados en una solución que contenía el medio Krebs-Ringer-Heppes (KH_2PO_4 155 mM, CaCl_2 37,8 mM, KCl 770 mM, NaCl 770 mM, MgSO_4 775 mM) con 10^{-4} M

de 2-³H-DOG (10 μCi/ml), se lo incubo durante 10 min a 37° C. Se detuvo la reacción con el agregado de 500 μl de solución fisiológica con exceso de glucosa 10⁻² M . Luego se elimino el exceso de glucosa con tres lavados sucesivos de KRH frío y posteriormente se homogeneizaron las muestras en 0,3 M de NaOH en ultraturrax. Después de 48 h se tomaron dos alícuotas: una para la determinación de la concentración de proteínas según el método de Bradford; la segunda alícuota se utilizó para colocarla en un vial con liquido de centelleo y cuantificarla. Posteriormente se expresaron los resultados en función de los mg de proteínas.

Ensayos de Western Blot

Los ensayos de Western blot se realizaron para la cuantificación de los transportadores de glucosa de la isoforma GLUT-4, en microsomas del TAM y TAB de ratas controles e intoxicadas. La cantidad del transportador de glucosa GLUT-4, se determinó por el método de Towbin y col, 1979. Las proteínas de membrana microsomal (100 μg) se sembraron en un SDS-PAGE 9%, y se corrieron durante 2 a 5 hs a 80 V.

Luego se transfirieron las proteínas durante 6 hs en cámara fría a 50 Vts. Posteriormente se prehibridó la membrana con solución de bloqueo conteniendo 5% de leche descremada, 5% de sero albumina bovina (BSA), en buffer Tris 10 mM, pH 8- NaCl 150 mM-Tween 20% (TBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar la membrana se la incubó con el primer anticuerpo (dilución 1:1000, anti Glut4) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizó nuevamente una serie de lavados y se incubó con un segundo anticuerpo (anti Ig G de conejo, conjugado con peroxidasa) (1:200). Se reveló con un Kit de quimioluminiscencia (ECL) de Amersham. Se expusieron las membranas durante toda la noche y luego se revelaron.

Ensayo de luciferasa

La cantidad de 20µg de proteínas es suficiente para el ensayo de luciferasa. La técnica consiste básicamente en la medida de la luz emitida por los extractos celulares (ya que las membranas tienen pegado el segundo anticuerpo con peroxidasa) al agregarle el sustrato (luciferasa). Luego se exponen a placas de autorradiografías por distintos períodos de tiempo.

DATERMINACIONES HORMONALES

Determinación de la concentración tisular de hormonas tiroideas

La determinación de las concentraciones tisulares de las hormonas tiroideas se realizó por el método radioinmunoanálisis (RIA) altamente sensible y específico descrito por Morreale de Escobar y col (1985). En breve: Las muestras de los diferentes tejidos fueron homogeneizadas en metanol y purificadas utilizando como solvente de extracción cloroformo-metanol, una reextracción en fase acuosa seguida de una purificación de esta última en columnas de resina (Bio-Rad, Richmond, CA) (Morreale de Escobar y col., 1985). Se determinó la concentración de hormonas tiroideas en extractos purificados, utilizando un método de RIA altamente específico y sensible para T₃ y T₄ (Obregon y col., 1978; 1981). Los límites de detección fueron de 2,5 pg T₄ y 1.5 pg T₃/tubo. La reacción cruzada para los RÍAs para T₄ y para T₃ fue reportada previamente (Ruiz de Oña y col., 1991). Las muestras fueron procesadas por duplicado y se realizaron dos diluciones. Los resultados se calcularon utilizando los datos obtenidos por la adición de trazadores [¹³¹I]T₄ o [¹²⁵I]T₃ al homogenato. El agregado de estos trazadores se realizó en pequeñas cantidades para evitar la interferencia con los RÍAs. Las hormonas [¹³¹I]T₄, [¹²⁵I]T₃ de alta actividad específica y la [¹²⁵I]T₄ (3000 mCi/mg) fueron sintetizadas en los laboratorios de la Dra M.J.Obregón (1978). [¹³¹I]T₄, y [¹²⁵I]T₃

fueron utilizados como trazadores de recuperación durante el procedimiento de extracción, la [¹²⁵I]T₄ y la [¹²⁵I]T₃ se utilizaron como antígenos en los ensayos de los RIAs.

Las tiroides fueron procesadas individualmente. Ambas hormonas, T₄ y T₃ fueron determinadas en extractos de metanol del homogenato. La fracción libre de T₄ y T₃ fueron determinadas en extractos de metanol de la digestión proteolítica de la glándula, denominada T₄ y T₃ totales.

Determinación de concentraciones séricas de las hormonas tiroideas y TSH

La determinación de las concentraciones de las hormonas tiroideas séricas se realizó por el método radioinmunoanálisis (RIA), con técnica de doble anticuerpo - PEG (Diagnostic Product Corporation). Cada muestra fue ensayada por duplicado. La TSH fue medida con un Kit de RIA de acuerdo a los procedimientos para ratas provistos por la National Pituitary Agency, U.S.A.

Determinación de la concentración de noradrenalina

La concentración de noradrenalina se determinó en el tejido adiposo marrón. El TAM se homogeneizó en 0,4 M de ácido perclórico conteniendo 0,1 % EDTA, luego fue purificado por cromatografía sobre albumina y analizado por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con detección electroquímica (Sagnol y col., 1990).

Determinación de niveles séricos de insulina

La determinación de las concentraciones de insulina se realizó por el método radioinmunoanálisis (RIA), con técnica de doble anticuerpo - PEG (Diagnostic Product Corporation). Cada muestra fue ensayada por duplicado.

Determinaciones de glucosa y triglicéridos séricos

La determinación de la concentración sérica de glucosa se realizó por medio de un Kit- Metodo GOD/PAP-Trinder Color. La glucosa de la muestra es oxidada a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de peroxidasa, 4AF y fenol, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

La concentración de triglicéridos séricos se determinó por medio de un Kit colorimétrico (Kit de Wiener).

Medios Instrumentales

- Centrífugas Sorvall RC5. Ultracentrífuga Beckman, modelos L8-70R y L8-M.
- Contador de centelleo Beta, Beckman modelo LKB 1219.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160-180 A.
- Procesador de autorradiografías Kodak
- Densitómetro Scanner GS. Hoefer Scientific Instruments.
- Estufa de Hibridación Grant Boekel HIR12
- Microscopio de contrastes, con analizador de imágenes.

Estadística

Los valores representan la media (\pm ESM). Los datos se analizaron por medio del análisis de varianzas de uno o dos caminos, seguido por el test de Tukey, posteriormente al análisis de homogeneidad de varianzas testeado por el test de Barlett. En los casos en los cuales la homogeneidad de varianzas presentaba diferencias significativas entre los grupos a analizar, se procedió a la transformación logarítmica de los datos. Las diferencias entre ratas tratadas y controles se consideraron significativas para valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

Peso del cuerpo, peso del hígado y concentraciones séricas de T₄, T₃ y TSH

Para evaluar parámetros hepatosomáticos y el status tiroideo en nuestro sistema experimental, se midieron la relación Peso del Hígado/Peso corporal (índice hepatosomático), y la concentración de hormonas tiroideas séricas (**Tabla 1**). Luego de 4 semanas de intoxicación, el peso del hígado y índice hepatosomático aumentaron significativamente ($p < 0,01$). No se observaron diferencias en el peso del cuerpo a ningún tiempo de intoxicación.

La concentración sérica de T₄ disminuyó significativamente desde el día 3 de tratamiento ($p < 0,05$). La concentración sérica de T₃ se mantuvo dentro del rango normal en todos los grupos. Por otro lado, los valores séricos de TSH aumentaron significativamente a las 4 semanas de intoxicación ($p < 0,01$).

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS 5'D-I Y 5'D-II EN CONDICIONES DE TERMONEUTRALIDAD Y POR EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO

Para evaluar la contribución de los tejidos periféricos en el mantenimiento de los niveles séricos de T₃, se midió la actividad de la enzima 5'D-I de tiroides, hígado y riñón, así como también la actividad de la enzima 5'D-II del TAM, de ratas tratadas con HCB a distintos tiempos de tratamiento. Los resultados se presentan en la (**Figura 16**).

Hígado

La actividad basal de la enzima 5'D-I fue de $11,72 \pm 0,68$ pmol/min/mg proteína. La actividad de esta enzima hepática no mostró cambios significativos en experimentos de intoxicación en función del tiempo (**Figura 16**). Cuando se calculó la actividad total por órgano considerando el peso del hígado, se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) al día 30 de tratamiento, debido a un incremento en el tamaño del hígado (**Figura 17**).

Riñón

Como se muestra en la **figura 16** la actividad de la enzima 5'D-I disminuyó respecto a los controles desde los 7 días de tratamiento. Esta disminución fue significativa a los 15 y 30 días un 35,1% ($p < 0,05$) y un 59,6 % ($p < 0,03$), respectivamente. La actividad total por órgano disminuyó significativamente ($p < 0,03$) a los 21 y 30 días respecto de los animales controles (**Figura 17**).

Tiroides

En contraste con el hígado y el riñón, la actividad de la 5'D-I de tiroides aumentó significativamente un 14,3 % y un 21,0 % respecto a los controles (C: $174,5 \pm 3,6$; $p < 0,05$) a los 21 y 30 días respectivamente (**Figura 16**). El cálculo de la actividad total de la tiroides mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) a los 30 días de tratamiento (**Figura 17**).

Dado que por exposición aguda al frío se ha demostrado que la actividad de 5' D-I tiroidea aumenta debido al estímulo adrenérgico, evaluamos si el HCB modificaba la regulación normal de la enzima en estas condiciones.

Por exposición de las ratas al frío, la actividad basal de la 5'D-I aumentó un 407,7 %; ($p < 0,001$) respecto a su control en termoneutralidad. En las ratas intoxicadas expuestas al frío, la actividad de la 5'D-I aumentó un 124 % con respecto a su respectivo control (C: $708,9 \pm 64,3$ pmoles/min/mg, $p < 0,01$). Los valores de la

actividad de 5' D-I del grupo tratado con HCB aumentaron en frío respecto al grupo tratado en termoneutralidad (**Figura 18**).

TAM

La actividad basal de la 5'D-II del TAM fue de $24,81 \pm 5,47$ (fmol/h/mg proteína), la cual disminuyó en un 48 % ($p < 0,05$) a los 21 días de intoxicación con HCB. A los 30 días de tratamiento se observó una disminución en la actividad del mismo orden, aunque no significativa para el número de animales estudiados cuando se las comparó con las ratas controles.

Se ha demostrado que en ratas adultas, la estimulación adrenérgica del TAM desencadenada por la exposición al frío, incrementa la actividad de la 5'D-II, la cual a su vez es aumentada en el hipotiroidismo (Silva y Larsen 1985). Bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad de la enzima 5' D-II se incrementó en ratas controles expuestas al frío, cuando se las comparó con los valores en condiciones de termoneutralidad (**Figura 18**).

En forma similar a lo ocurrido en termoneutralidad, el HCB disminuyó la actividad de la enzima 5' D-II en frío, un 61 % comparada con sus respectivos controles (C: $40,2 \pm 7,3$ fmoles/min/mg prot. , $p < 0,01$).

CONCENTRACION DE HORMONAS TIROIDEAS EN LOS DIFERENTES TEJIDOS

Dado que una alteración en la actividad en las 5' D-I y 5' D-II puede modificar los niveles de las hormonas tiroideas tisulares, medimos las concentraciones de T_4 y T_3 en hígado, riñón, tiroides y TAM de ratas controles y tratadas con HCB (**Tabla 2**). Como se puede observar, los niveles de T_4 fueron normales en todos los tejidos estudiados de ratas intoxicadas.

Con respecto a las concentraciones de T_3 , no se observaron cambios significativos en la concentración de esta hormona en el hígado.

Por el contrario el tratamiento con HCB durante 30 días, disminuyó significativamente las concentraciones de T_3 en riñón y en el TAM en un 24,8 % y 18,3 % ($P < 0,05$) respectivamente.

El contenido total de T_4 y T_3 tiroidea presentó una tendencia a disminuir aunque no fue significativa. Del mismo modo las concentraciones de HT libres en la tiroides de ratas tratadas con HCB mostraron una tendencia a aumentar aunque no en forma significativa para el número de animales estudiados.

EFFECTO DEL HCB SOBRE LA EXPRESION DEL GEN DE LAS ENZIMAS 5'D-I Y 5' D-II

El análisis de los niveles de RNAm de la 5'D-I de hígado, riñón y tiroides y de la 5'D-II de TAM de ratas controles y tratados con HCB por 30 días mostró que no hubo cambios en los mismos en ninguno de los tejidos estudiados (**Figura 19**).

ACTIVIDAD DE UDPGT DE T_4 Y T_3 HEPATICAS

Con el propósito de investigar si los bajos valores de T_4 sérica observados en las ratas intoxicadas con HCB se debían a un aumento en la glucuronidación de la hormona, medimos la actividad de la enzima glucuronidante UDPGT para T_4 (UDPGT- T_4) en hígado de ratas controles e intoxicadas en función del tiempo de tratamiento. Asimismo se midió la actividad de la UDPGT para T_3 (UDPGT- T_3). La UDPGT- T_4 se midió en presencia de Brij 56, indicando que la glucuronidación de T_4 tenía lugar por la fenol-UDPGT como mostraron otros autores (Visser y col., 1993). Nuestros resultados mostraron que la UDPGT para T_4 aumentó en forma dependiente del tiempo desde los 3 días de tratamiento, siendo significativo el

incremento desde los 7 días en adelante (**Figura 20 a**). En contraste con el marcado aumento de la actividad glucuronidante para T₄, el HCB no produjo cambios en la actividad de la UDPGT hepática para T₃ (**Figure 20 b**).

PARAMETROS MARCADORES DE LA FUNCIONALIDAD Y REGULACION DEL TAM

Con el objeto de evaluar si el HCB modificaba parámetros marcadores de la funcionalidad y regulación del TAM se analizaron los niveles de RNAm de UCP-1 y el contenido tisular de noradrenalina en este tejido.

Contenido de RNAm de la UCP-1 del TAM

Como se observa en la **figura 21**, el contenido de RNAm de la UCP-1 no se modificó por efecto del HCB ni en termoneutralidad (a) ni en frío (b). Se observa de acuerdo a lo esperado, un aumento del 180% en los valores controles por la exposición al frío comparados con los controles en termoneutralidad (C: $2,6 \pm 0,8$ unidades arbitrarias (UA); $p \leq 0,03$). Esta diferencia en el contenido de RNAm entre los controles de ambos grupos (termoneutros y expuestos a 4 °C), se debe a la estimulación adrenérgica que recibe el TAM ante el estímulo del frío.

La noradrenalina (NA) vía receptores β_1 aumenta la transcripción de la enzima termogénica para responder a las nuevas demandas energéticas del tejido.

Por otro lado, la NA evaluada en termoneutralidad, no presentó modificaciones en los animales tratados con HCB (**Tabla 3**). Este resultado indicaría que en el mecanismo de acción del HCB no estaría involucrado un cambio en la concentración tisular de NA.

Dado que las hormonas tiroideas junto con la NA son los principales factores que regulan la expresión de la UCP-1, y que la concentración de T₃ en este tejido

disminuyó en un bajo porcentaje en termoneutralidad, es lógico esperar que la expresión del gen de la UCP-1 no se vea afectada por el tóxico.

PARAMETROS DEL METABOLISMO LIPIDICO

Actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa

Con el objeto de analizar las posibles modificaciones metabólicas que puedan explicar el acumulo de lípidos observados en preparaciones histológicas del TAM en presencia de HCB (Alvarez L, 1997), se midió la actividad de una de las enzimas claves en la síntesis de ácidos grasos: la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC). Como se observa en la **Figura 22**, esta enzima no presento modificaciones en su actividad a los 30 días de intoxicación con HCB.

Enzima Lipoprotein-lipasa

Dado que el contenido tisular de triglicéridos puede generarse a partir de ácidos grasos sintetizados en el tejido, o del ingreso de los mismos a partir de los ácidos grasos circulantes, se midió la actividad de la enzima Lipoproteinlipasa (LPL) y el contenido de RNAm de la misma.

Como se observa en la **figura 23**, la actividad de la enzima LPL presentó un aumento del 42% con respecto a los controles a los 30 días de tratamiento (C: 5501 ± 492 ; $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, $p < 0,03$); sin embargo el contenido de RNAm no se modificó (**Figura 24**), lo que descartaría un efecto del tóxico a nivel transcripcional. Con respecto a los niveles de triglicéridos séricos, se observo una disminución significativa del 42 % ($p < 0,03$) respecto de las ratas controles (**Tabla 3**).

Captación de glucosa

Otro factor que podría contribuir a un incremento en el contenido de triglicéridos del TAM podría ser el aumento de la captación de glucosa, una de las posibles fuentes dadoras del intermediario glicerol-3-fosfato, esqueleto necesario para la síntesis de triglicéridos. En el presente trabajo evaluamos la captación de glucosa en función del tiempo de tratamiento, así como la cantidad de la isoforma GLUT-4, evaluada por Western blot, del transportador de glucosa predominante en un 95% en el TAM a los 30 días de tratamiento con HCB.

Como se observa en la **Figura 25 a**, la captación de ^3H -Glucosa aumento 37 % , ($p < 0,01$) respecto al control en las ratas intoxicadas con HCB por 30 días (C: $1892 \pm 84,7$ dpm/mg prot.). Contrariamente en el TAB no se observaron modificaciones en la captación de glucosa a los 30 días de drogado, observando una disminución significativa a tiempos cortos de intoxicación, **Figura 25 b**.

Los niveles del transportador evaluados por Western Blot, GLUT-4 en las ratas intoxicadas aumentaron significativamente en 90 % ($p < 0,01$) (**Figura 26**).

La **Tabla 3** muestra que los niveles séricos de glucosa e insulina no se modificaron por efecto del HCB, sugiriendo que las alteraciones en la captación de glucosa no estarían mediadas por un aumento en la concentración sérica de ninguno de los dos compuestos. Tampoco la NA estaría estimulando el aumento en la captación de glucosa dado que la misma no modificó su concentración en el TAM, como se demostró anteriormente.

RESULTADOS

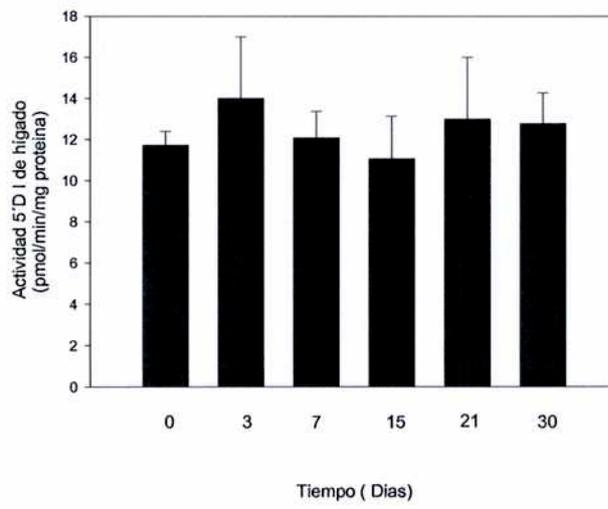
Tabla 1. Efecto del HCB sobre el peso corporal, peso del hígado, concentración de hormonas T₄, T₃ y TSH., en función del tiempo de intoxicación.

HC B (Días)	T ₄ (μg/dl)	T ₃ (ng/dl)	TSH (ng/ml)	P.C. (g)	Hígado (g)	H/P.C. (x100)
0	5,0 ± 0,40	68,0 ± 4,00	2,8 ± 0,27	248,4 ± 14,7	8,7 ± 0,66	3,5 ± 0,20
3	4,0 ± 0,30 ^a	59,0 ± 6,50	ND	250,4 ± 23,5	9,1 ± 0,56	3,8 ± 0,23
7	1,5 ± 0,15 ^b	56,8 ± 7,00	2,9 ± 0,15	270,5 ± 30,1	8,8 ± 0,49	3,3 ± 0,29
15	1,4 ± 0,16 ^b	58,8 ± 6,00	2,6 ± 0,13	269,5 ± 32,1	8,6 ± 0,51	3,4 ± 0,32
21	1,6 ± 0,17 ^b	58,0 ± 6,10	ND	259,6 ± 25,7	8,9 ± 0,71	3,4 ± 0,31
30	1,0 ± 0,01 ^b	57,0 ± 7,00	5,3 ± 0,40 ^c	263,6 ± 21,7	12,2 ± 0,50 ^a	4,6 ± 0,26 ^a

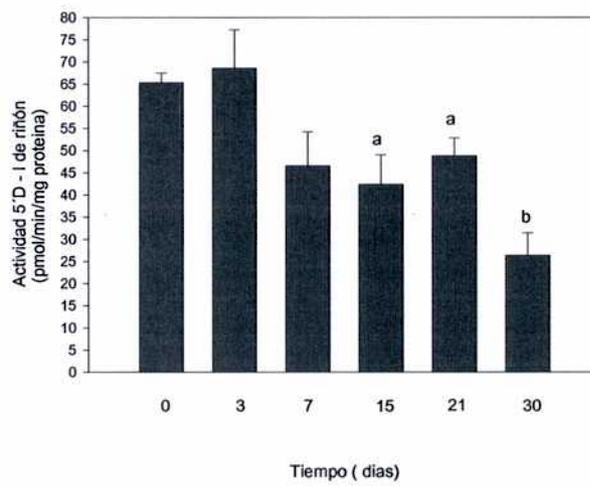
El HCB (1000 mg / kg p.c.) fue suministrado por intubación gástrica, durante 3, 7, 15, 21 y 30 días. Los niveles séricos de T₄, T₃ y TSH se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. Los valores representan la media ± ESM para n=5 animales. H/P.C. [Peso hígado (g)/peso corporal (g) x100]. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^a p < 0,05; ^b p < 0,03; ^c p < 0,01 (Tukey test).

Figura 16. Cambios dependientes del tiempo en la actividad de la 5'D-I de hígado, riñón y tiroides y 5'D-II de TAM.

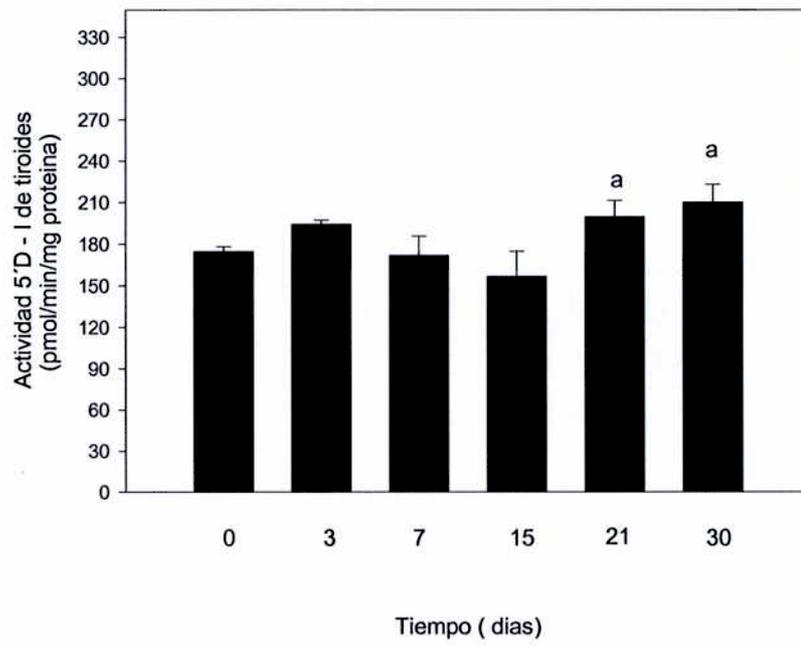
HIGADO



RIÑÓN



TIROIDES (a)



TAM (b)

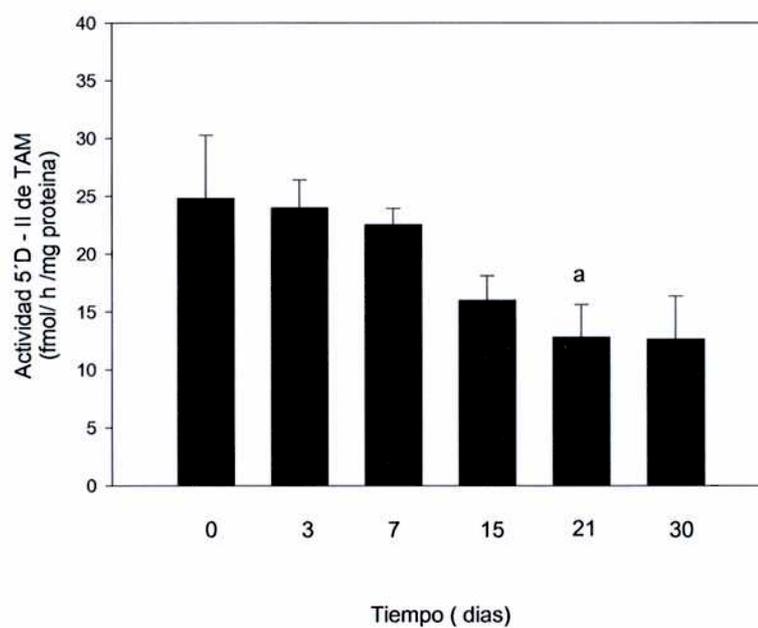
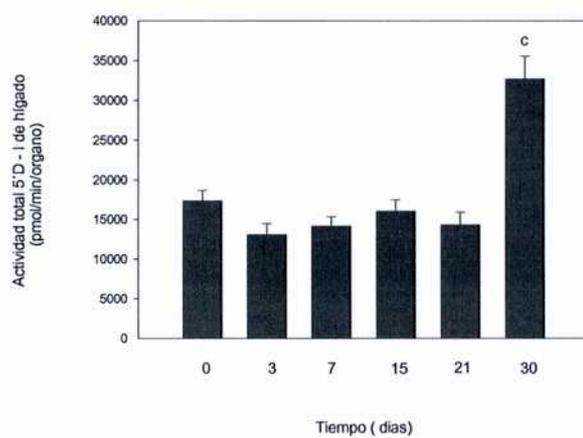


Figura 16. Los animales fueron tratados con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo por 3, 7, 15, 21 y 30 días. Los valores representan la media \pm ESM para n=4 ratas controles y n=3 para ratas tratadas. Las diferencias significativas contra los valores controles fue de: ^a p <0,05; ^b p < 0,03.

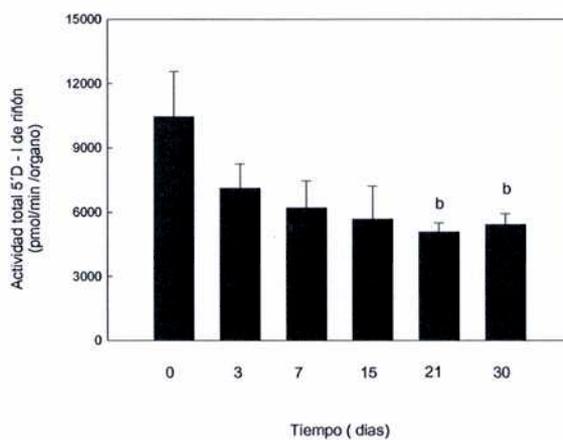
Figura 17. Actividad total de la enzima 5' D-I (expresada como pmol/ min /órgano) en el hígado, riñón y tiroides de ratas tratadas con HCB.

A

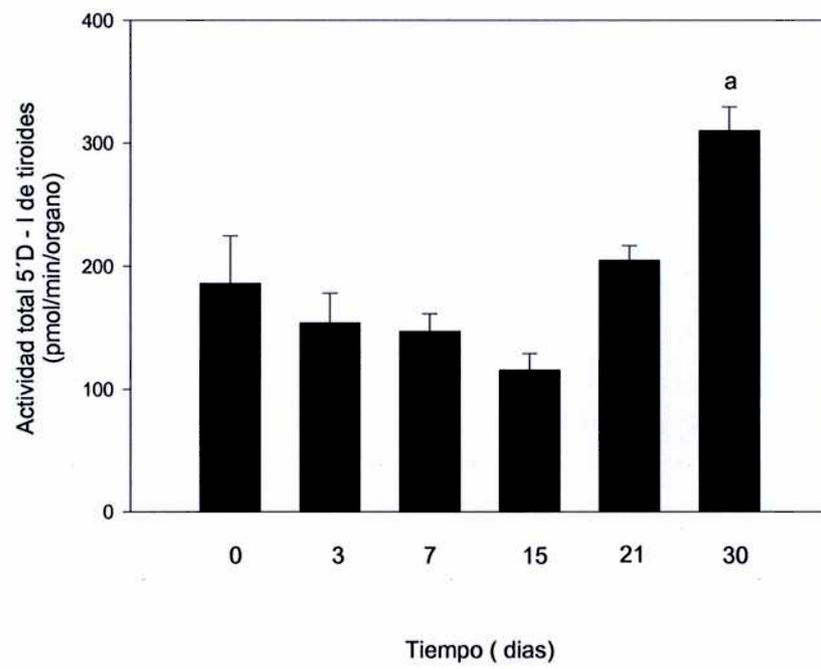
HIGADO



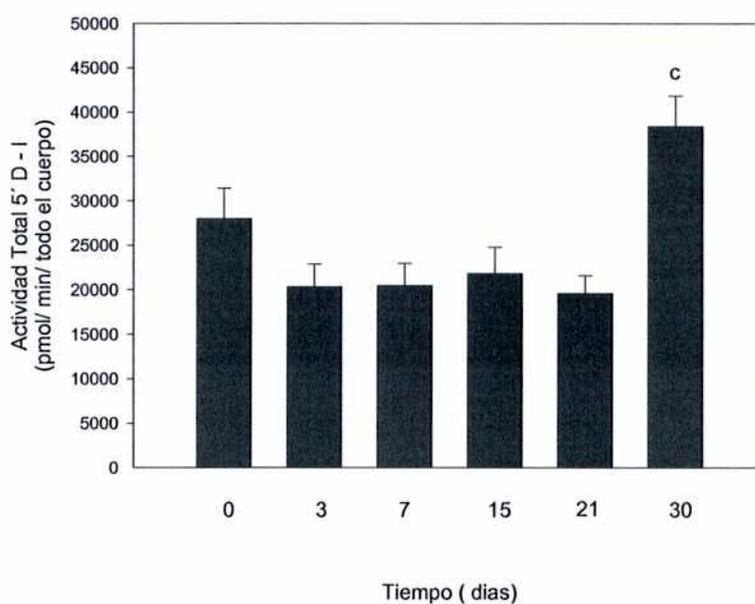
RIÑÓN



TIROIDES



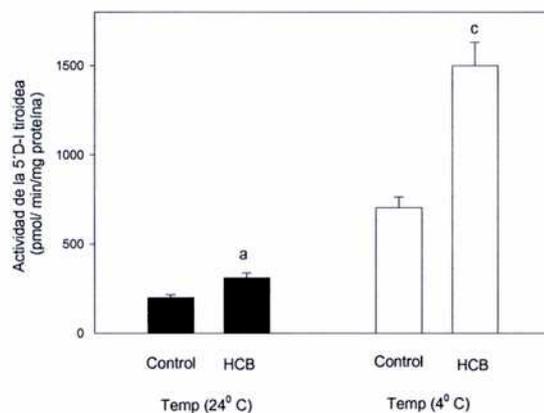
B. Actividad total corporal de la enzima 5' D-I



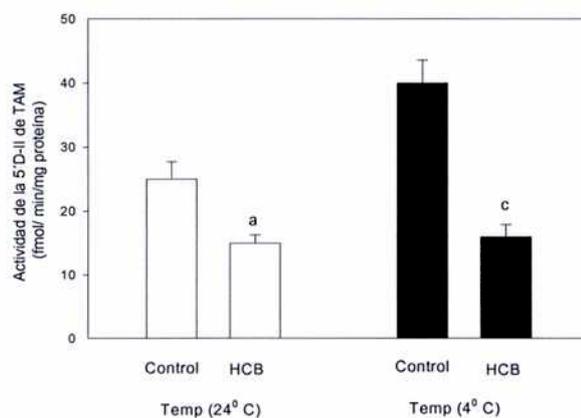
B: La actividad total corporal de la enzima 5' D-I fue calculada por la suma de las actividades enzimáticas totales de cada órgano (expresada como pmol /min/todo el cuerpo) en el hígado, riñón y tiroides. Los animales fueron tratados con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo por 3, 7, 15, 21 y 30 días. Los valores representan la media \pm ESM para n=4 en las ratas controles y n=3 en las ratas tratadas. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^a p < 0,05; ^b p < 0,03; ^c p < 0,01.

Figura 18 Actividad de la deiodinasa 5'D-I de tiroides y 5'D-II de TAM de ratas tratadas con HCB expuestas al frío.

TIROIDES (a')



TAM (b')



Se determinó la actividad de la deiodinasa 5'D I de tiroides y 5'D II de TAM de ratas tratadas con HCB. Los animales fueron tratados con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo 30 días. Las ratas se expusieron al frío por 24 hs antes del sacrificio. Los valores representan la media \pm ESM para n=4 animales en las ratas controles y n=3 animales en las ratas tratadas. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^a p <0,05; ; ^c p <0,03.

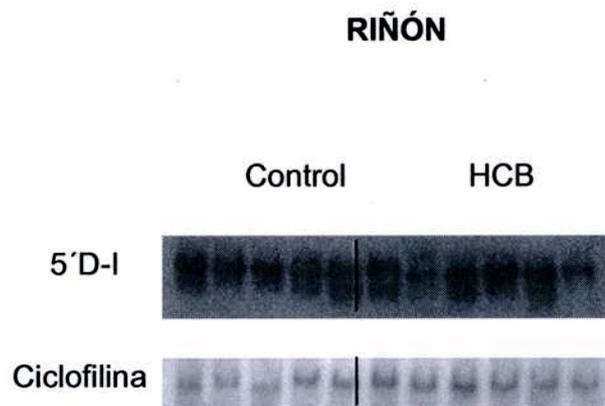
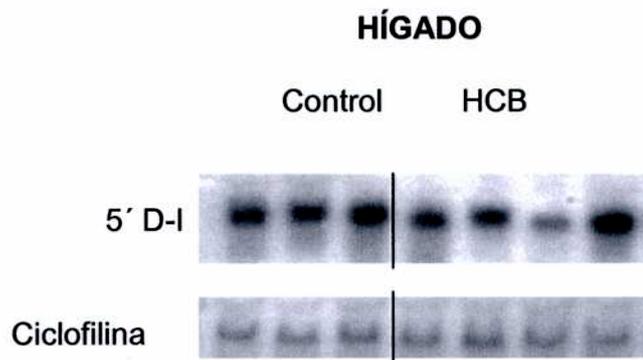
Tabla 2. Concentración de hormonas tiroideas en varios tejidos.

Tejidos	T₄ (ng/g)		T₃ (ng/g)	
	CONTROL	HCB	CONTROL	HCB
Hígado	34,40 ± 4,04	29,70 ± 4,23	4,89 ± 0,30	4,37 ± 0,51
Riñón	19,45 ± 2,11	13,05 ± 1,42	6,78 ± 0,39	5,10 ± 0,14 ^a
TAM	4,14 ± 0,41	4,06 ± 0,10	0,93 ± 0,03	0,76 ± 0,02 ^a
	T₄ Total (ng/tiroides)		T₃ Total (ng/tiroides)	
Tiroides	2356,58 ± 554,64	1808,90 ± 194,90	433,84 ± 122,62	286,52 ± 52,82
	T₄ Libre (pg/tiroides)		T₃ Libre (pg/tiroides)	
Tiroides	1285,80 ± 457,40	2400,00 ± 354,00	4544,00 ± 1056,00	8891,20 ± 3090,00

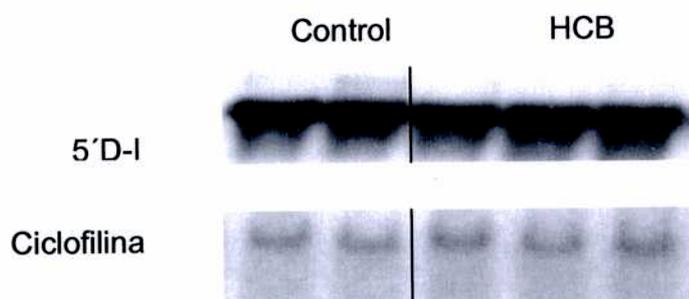
Los resultados representan la media ± ESM de n=4 para las ratas controles y n=3 para los animales tratados. El HCB (1000 mg / kg p.c.) fue suministrado por intubación gástrica, durante 30 días. Las diferencias significativas respecto de los grupos controles fueron de: ^a p<0,05.

Figure 19. Expresión de los RNAm de las enzimas 5' D-I y 5' D-II en diferentes tejidos de ratas tratadas con HCB.

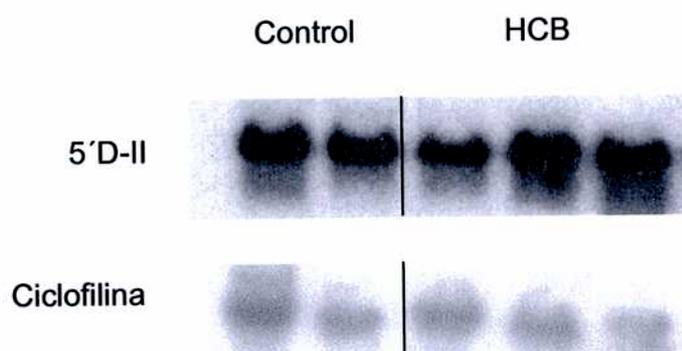
A



TIROIDES



TAM



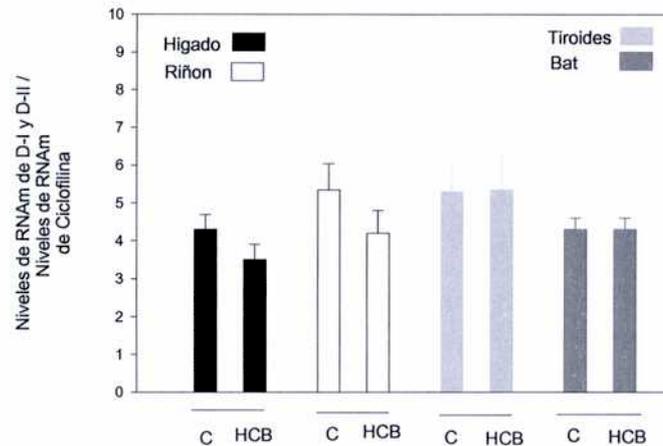
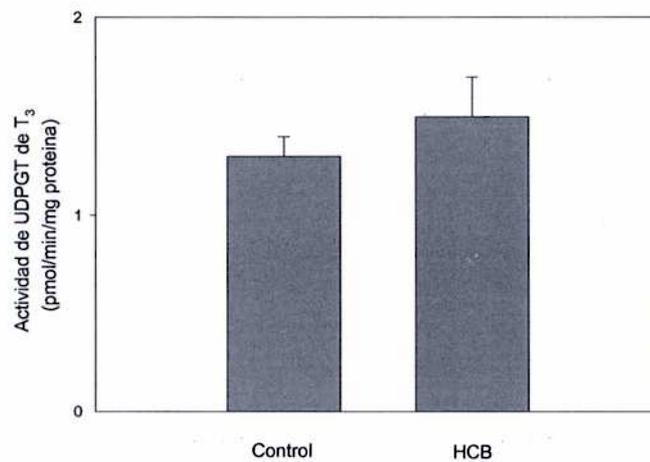
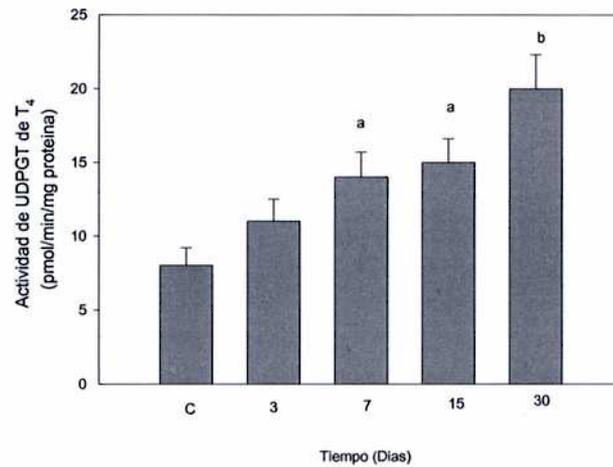


Figura 19. A. Expresión de los RNAm de las enzimas 5'D-I y 5'D-II en diferentes tejidos de ratas tratadas con HCB. Se cuantificaron los RNAm de hígado, riñón, tiroides y TAM de ratas tratadas con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo, por 30 días. Se sembraron RNA total (40µg, 40µg, 30µg y 30µg) para hígado, riñón, tiroides y TAM, respectivamente. En la figura se muestra un experimento de Northern blot representativo para cada tejido. Para corregir posibles diferencias entre de la `masa sembrada entre carriles, se utilizó como control de carga a la Ciclofilina.

B: Cuantificación del RNAm normalizado con el control de carga Ciclofilina. El grafico representa los valores obtenidos por escaneos densitometricos de autorradiografias provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM.

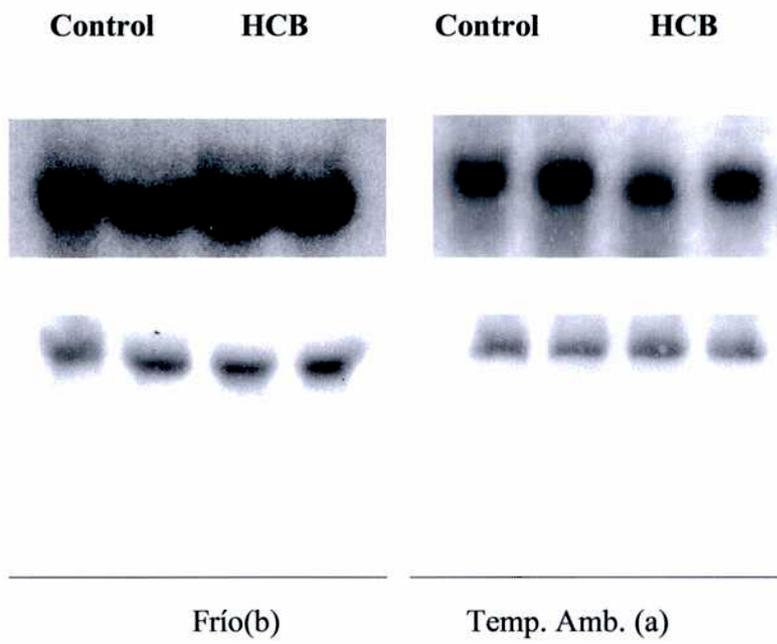
Figura 20 a y b. Efecto del HCB sobre la actividad de UDPGT- T₄ y UDPGT-T₃



Se determinó la actividad de UDPGT- T₄ y UDPGT-T₃ en microsomas de hígados de ratas controles y tratadas con HCB. Los resultados representan la media \pm ESM de n= 5 animales por grupo. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^a p < 0,05; ^b p < 0,03.

Figure 21. Expresión de los RNAm de la proteína UCP-1 del TAM

A



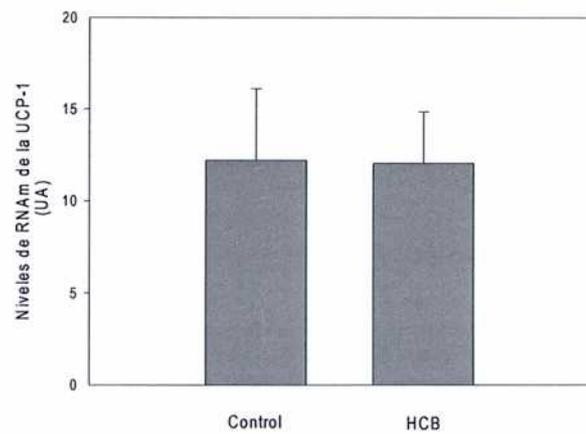
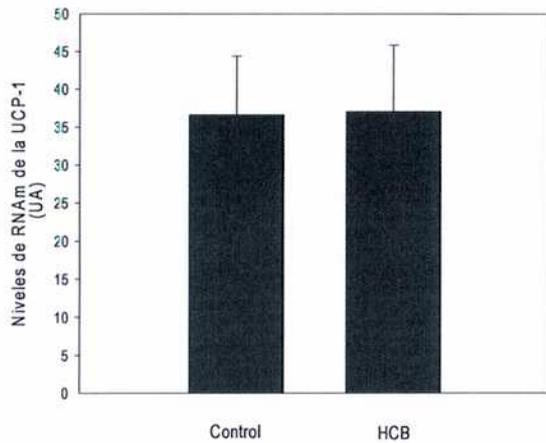


Figura 21. A: Se determinó el RNAm de la proteína UCP-1 del TAM de ratas tratadas con HCB en termoneutralidad (a) y expuestas al frío (b). Se cuantificó el RNAm de UCP-1 del TAM de ratas tratadas con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo, por 30 días. Se sembró 30µg de RNA total por carril. En la figura se muestra un experimento de Northern blot representativo. Para corregir posibles diferencias entre de la masa de RNA sembrada entre carriles, se utilizó como control de carga a la Ciclofilina.

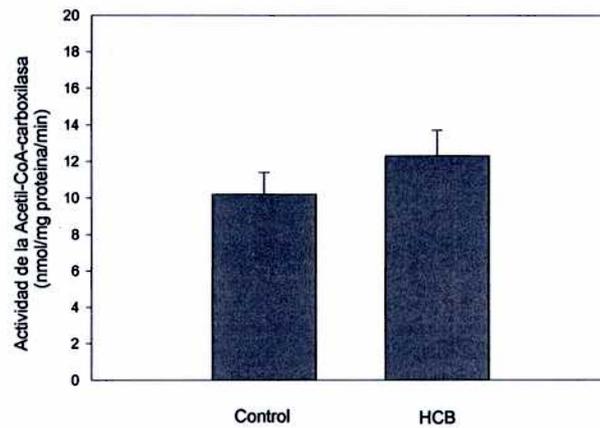
B: Cuantificación del RNAm normalizado con el control de carga Ciclofilina. El grafico representa los valores obtenidos por escaneos densitometricos de autorradiografias provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. Las diferencias significativas respecto a los grupos control y HCB a termoneutralidad ambiente fueron de: ^a $p < 0,05$

Tabla 3. Concentración sérica de los niveles de noradrenalina, glucosa e insulina y triglicéridos

	Noradrenalina (pg/g)	Insulina (UI)/ml	Triglicéridos (μg/dl)	Glucosa (g/l)
Control	580 ± 118	93,5 ± 10,8	60.7 ± 9.6	1892,8 ± 85,9
HCB	639 ± 67	141,2 ± 27,3	31.0 ± 4.4 ^b	2196,1 ± 86,6

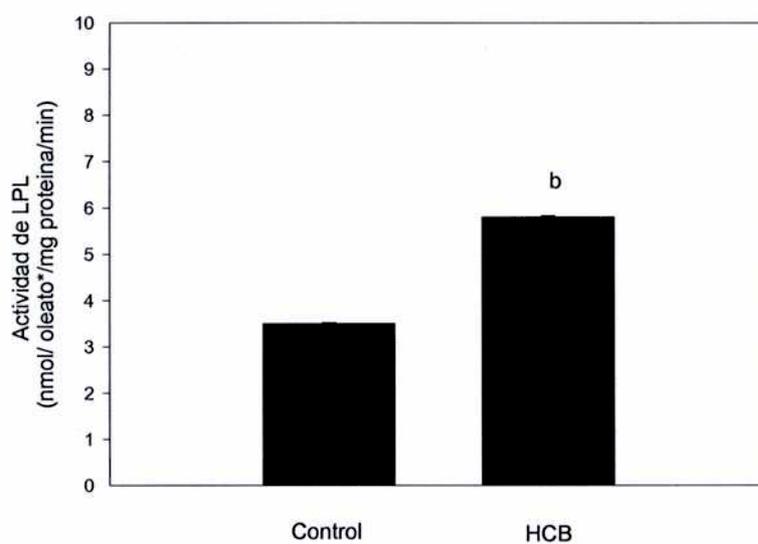
Concentración sérica de los niveles de noradrenalina, glucosa e insulina y triglicéridos en ratas tratadas con HCB durante 30 días. El HCB (1000mg/ kg p.c.) o vehículo se suministró a las ratas durante 30 días. Los valores representan la media ± ESM. Los valores representan la media ± ESM. Las diferencias significativas respecto a los grupos control y HCB a termoneutralidad ambiente fueron de: ^b < p 0,03.

Figura 22. Actividad de la Acetil-CoA carboxilasa (ACC) de TAM



Se determinó la actividad de la Acetil-CoAcarboxilasa (ACC) de ratas tratadas con HCB. Se suministró HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo, por 30 días. Los valores representan la media \pm ESM.

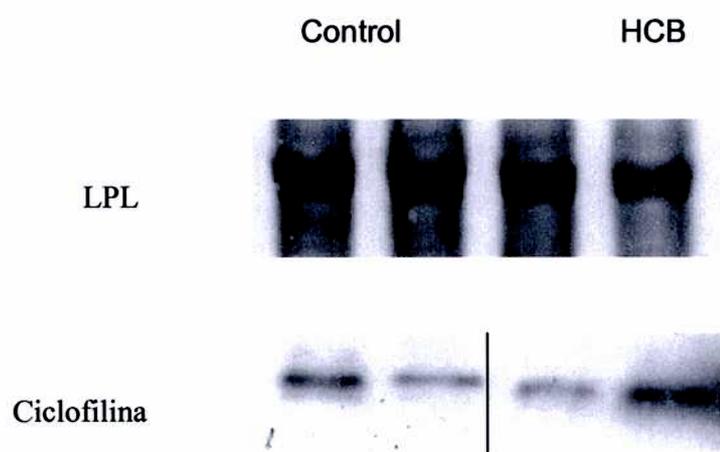
Figura 23. Efecto del HCB sobre la actividad de la enzima lipoproteinlipasa (LPL)



Se determinó la actividad de la LPL en ratas controles y tratadas con HCB (1000 mg / kg p. c.) por 30 días. Los resultados representan la media \pm ESM de n= 5 animales por grupo. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^b p < 0,03.

Figure 24. Expresión de los RNAm de la enzima LPL en el TAM

A



B

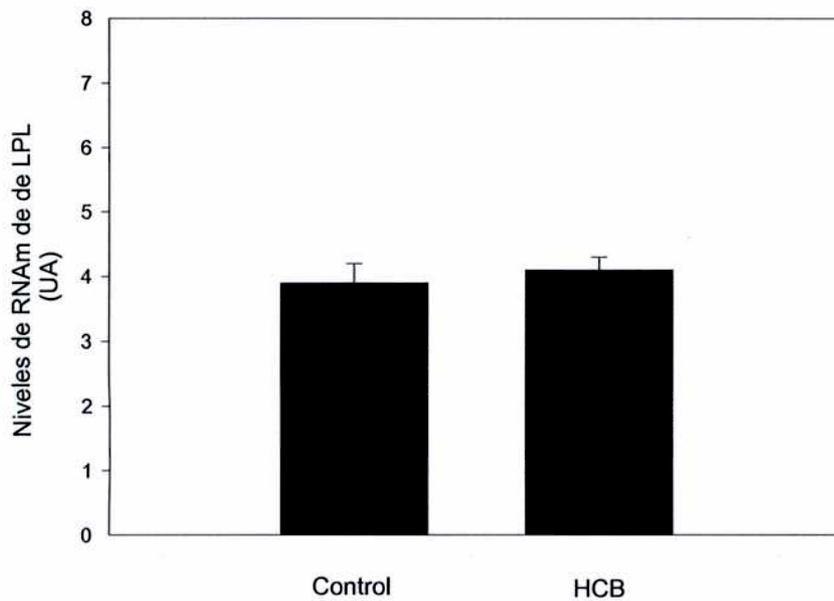
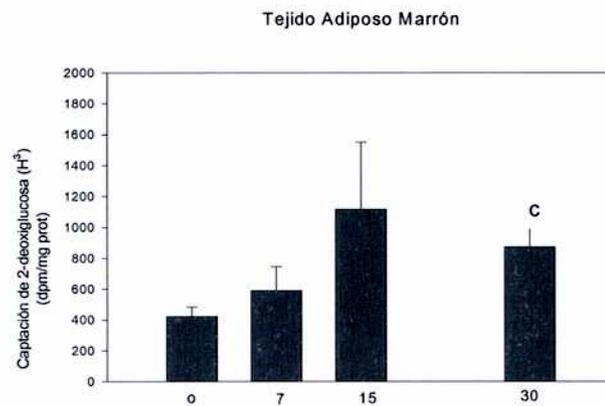


Figura 24. A: Se determinó la expresión de los RNAm de la enzima LPL en el TAM de ratas tratadas con HCB. Se cuantificó el RNAm de TAM de ratas tratadas con HCB (1000 mg / kg p. c.) o vehículo, por 30 días. Se sembraron 30 μ g de RNA total por carril. En la figura se muestra un experimento de Northern blot representativo. Para corregir posibles diferencias entre la masa sembrada entre carriles, se utilizó como control de carga a la Ciclofilina.

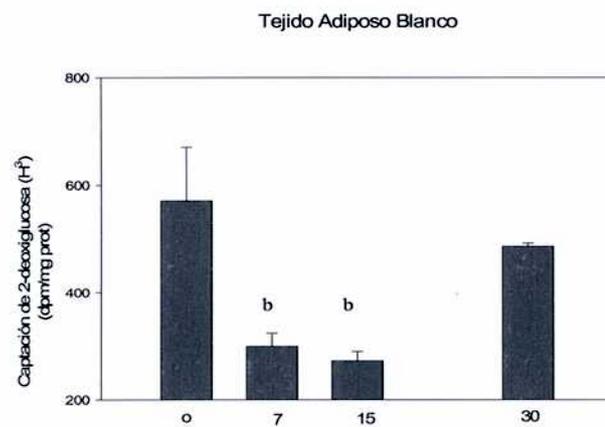
B: Cuantificación del RNAm normalizado después de la corrección con el control de carga. El grafico representa los valores obtenidos por escaneos densitométricos de autorradiografías provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM.

Figura 25 a y b. Efecto del HCB sobre la captación de ^3H -2-deoxiglucosa de TAM y TAB

a



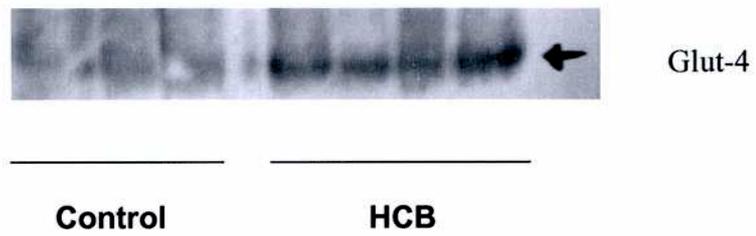
b



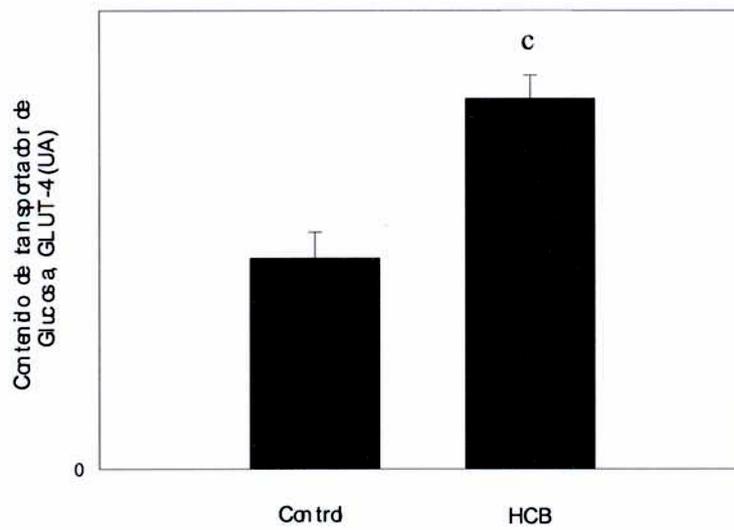
Se determinó la captación de ^3H -2-deoxiglucosa de ratas controles y tratadas con HCB (1000 mg / kg p. c.) por 30 días. Los resultados representan la media \pm ESM de $n= 5$ animales por grupo. Las diferencias significativas contra los valores controles fueron de: ^b $p < 0,03$; ^c $p < 0,01$.

Figure 26. Contenido del transportador de GLUT-4 de TAM

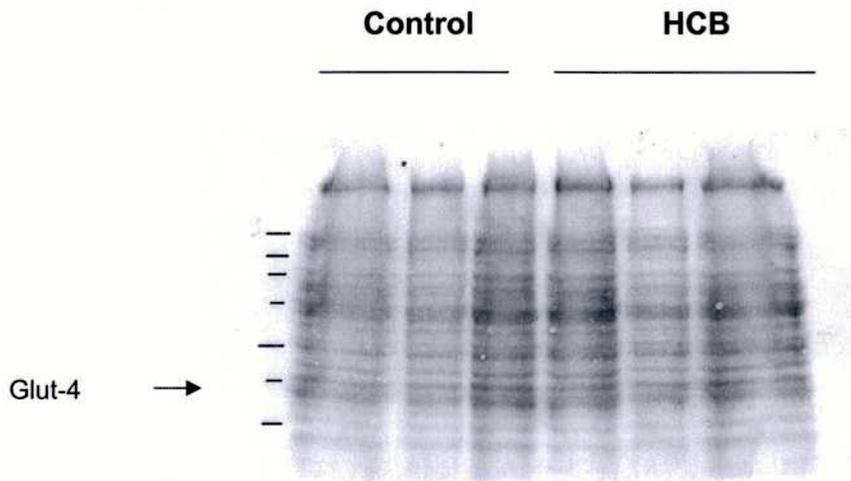
A



B



C



A: Se determinó el contenido del transportador de GLUT-4 de TAM de ratas tratadas con HCB. Se cuantificó el contenido del transportador GLUT-4 de ratas tratadas con HCB (1000mg/ kg de p.c.) durante 30 días de intoxicación. Se sembraron 75µg de proteína por carril. En la figura se muestra un experimento de Western blot representativo.

B: Cuantificación del contenido de GLUT-4 normalizado con el control de carga después de la corrección con el control. El grafico representa los valores obtenidos por escaneos densitometricos de autorradiografias provenientes de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. Las diferencias significativas respecto a los grupos control y HCB a termoneutralidad ambiente fueron de: ^a < p 0,05

C: Para corregir posibles diferencias entre de la masa sembrada entre carriles, se utilizó como control de carga la tinción de la membrana del Western , previo al incubado con los anticuerpos.

DISCUSSION

Discusión

Los tóxicos aromáticos polihalogenados producen alteraciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas, pero pese a los numerosos estudios publicados no está claro hasta el presente el mecanismo de acción involucrado. El estudio del estatus tiroideo en ratas intoxicadas con HCB es de particular interés ya que los animales presentan muy bajos niveles de T_4 sérica, mientras que los niveles de T_3 se mantienen normales (Sopena de Kracoff y col., 1994; Rozman y col., 1986; Van Raaij y col., 1993). La mayor parte de la T_3 sérica en la rata se produce por la conversión en hígado y riñón de T_4 a T_3 , aunque otras fuentes pueden ser relevantes bajo ciertas condiciones fisiológicas como en rata alimentadas con dieta baja en yodo (Pazos-Moura y col., 1991). La deiodinación por la 5' D-I ha sido considerado la principal vía de deiodinación periférica de T_4 a T_3 en ratas eutiroides. Por el contrario se ha reportado que la deiodinación por la 5' D-II es la vía principal de generación de T_3 extratiroidea cuando los niveles de enzima están suficientemente elevados y/o la actividad de la 5' D-I hepática o renal están disminuídas como demostraron Silva y Larsen, (1985) en ratas expuestas al frío. El presente trabajo fue realizado con el propósito de examinar si un aumento en la conversión de T_4 a T_3 catalizada por las 5' D-I y/o 5' D-II de la tiroides y varios tejidos periféricos podrían explicar los niveles de T_3 séricos normales en ratas con hipotiroxinemia inducida por HCB. Todos los tejidos estudiados eran tejidos blanco de la toxicidad inducida por HCB (Sopena de Kracoff Y col., 1994, Kleiman de Pisarev DL col., 1990, Rozman K y col., 1986; Alvarez y col., 1999, 2000).

El análisis del índice hepatosomático en las ratas intoxicadas con HCB, mostró que de acuerdo a lo esperado aumentó a los 30 días de tratamiento. El incremento en el tamaño del hígado como respuesta a la intoxicación por HCB y otros tóxicos aromáticos polihalogenados, se debe fundamentalmente a una hiperplasia e hipertrofia de las células parénquimáticas, especialmente por proliferación del retículo endoplasmático liso, acompañados por un incremento en la actividad de monooxigenasas microsomales (Fowler y col., 1973). Otros autores observaron

que el aumento del tamaño del hígado en ratas intoxicadas con TCDD, no solo reflejaba una inducción enzimática, sino también cambios en el contenido lipídico (Birnbbaum, 1994).

Nuestros resultados mostraron que la actividad de la 5' D-I hepática no se modificaba por efecto del HCB, pero debido al aumento en el peso del hígado a los 30 días de exposición, la actividad total calculada por todo el órgano aumentaba. Estos resultados sugieren que el hígado podría contribuir al mantenimiento de las concentraciones normales de T₃ sérica en ratas intoxicadas en forma crónica. Contrariamente van Raaij y col. (1993) reportaron que el tratamiento con HCB disminuía la actividad de la 5' D-I hepática en ratas. Las razones para tal discrepancia podrían deberse a diferencias en la especie de ratas usadas o al diseño experimental.

En relación a las concentraciones tisulares de hormonas tiroideas, la concentración de tiroxina total no se alteró en ninguno de los tejidos estudiados pese a las bajas concentraciones de T₄ sérica, probablemente como consecuencia del desplazamiento de la T₄ de sus proteínas transportadoras plasmáticas por el pentaclorofenol, un metabolito del HCB, como sugirieron van Raaij y col. (1991). Tampoco la concentración de T₃ se modificaba por el tratamiento con HCB. Es interesante señalar que estos resultados concuerdan con resultados previos de nuestro laboratorio, que demostraron que el tratamiento con HCB no producía alteraciones en el estatus tisular tiroideo hepático, evaluado por las actividades de enzimas hormono-tiroideas dependientes (Kleiman de Pisarev DL y col., 1995).

En forma contraria a lo observado en hígado, la actividad de 5' D-I renal disminuía significativamente en ratas intoxicadas. Esta reducción en la actividad de la 5' D-I se veía reflejada en la disminución de la concentración renal de T₃. Aunque la actividad de la 5' D-I disminuía en las ratas intoxicadas, el contenido de RNAm no difería del de los animales controles. Estos resultados sugieren que el HCB podría actuar inhibiendo directamente la actividad enzimática o la síntesis de la enzima

en un mecanismo post-transcriptacional. Al respecto se ha reportado que el HCB modifica las propiedades fisicoquímicas de la uroporfirinógeno decarboxilasa produciendo una disminución en su actividad y el desencadenamiento de la pofiria cutánea tarda (Chaufan G y col., 2001). Otro pesticida, el metoxiclor, interfiere con el metabolismo de las hormonas tiroideas uniéndose a la cisteína 372 o 375 o a la lisina 376 de la 5' D-I hepática (Zhou LX y col., 1995).

Se ha reportado que la conversión intratiroidea de T_4 a T_3 podría dar cuenta de la mayor parte de la T_3 liberada por la tiroides (Chanoine y col., 1993). En este trabajo hemos demostrado un pequeño pero significativo aumento en la actividad de la 5' D-I tiroidea a los 21 y 30 días de tratamiento, sugiriendo que la tiroides no contribuye en forma significativa al mantenimiento de la T_3 sérica a tiempos más tempranos de intoxicación. Los valores inalterados del RNAm de la enzima en ratas tratadas sugieren que el mecanismo de acción del HCB sería a nivel posttranscripcional.

Erickson y col. (1982) demostraron que la TSH aumenta la actividad de la 5' D-I tiroidea. Como en nuestro modelo experimental la TSH sérica aumenta a las 4 semanas de tratamiento, parecería posible entonces que la actividad de la 5' D-I tiroidea estuviera aumentada contribuyendo de este modo a un aumento en la secreción de T_3 para el mantenimiento de sus niveles normales en suero. Sin embargo la TSH sérica no estaba aumentada a tiempos más tempranos de tratamiento, en los que la T_4 sérica se encontraba significativamente disminuída, sugiriendo que el aumento de la TSH no es atribuible a la disminución de los niveles de T_4 . En forma similar se ha demostrado que la administración de 3-metoxicolantreno y Aroclor 1254 (PCBs) producían una disminución de las concentraciones de T_4 total y libres, pero no aumentaban la concentración de TSH sérica (Liu y col., 1995). Una hipótesis atractiva sería que la actividad de la 5' D-I en la pituitaria podría estar aumentada a tiempos cortos de tratamiento con HCB, sugiriendo un efecto de feedback negativo sobre la síntesis y secreción de TSH, que mantendría las concentraciones séricas de TSH normales durante las primeras semanas de tratamiento.

Como la concentración total de T_4 tiroidea no estaban alteradas por la administración de HCB, probablemente habría suficiente T_4 proveniente de la tiroglobulina o por desplazamiento de las proteínas transportadoras del plasma, como se sugirió anteriormente, para permitir una significativa formación de T_3 vía la actividad aumentada de 5' D-I. Al respecto cabe señalar que se ha demostrado que las hormonas tiroideas libres pueden entrar a la tiroides en experimentos realizados en cortes de tiroides bovina (Juvenal y col., 1980).

En estudios previos hemos demostrado asimismo que ni la captación de $[I^{125}]$, el primer paso en la síntesis *de novo* de las hormonas tiroideas, ni la biosíntesis tiroidea de T_3 en relación a T_4 estaban afectadas por el HCB (Kleiman de Pisarev y col., 1990).

En este trabajo hemos analizado también el efecto potencial de la 5' D-II del TAM de generar T_3 para el pool de hormona circulante. Esta enzima produce la mayor parte de la T_3 presente en el TAM por deiodinación de T_4 (Silva y Larsen, 1985). En las curvas de tiempo la actividad de la 5' D-II disminuía significativamente a los 21 días de administración de HCB, sugiriendo que el TAM no jugaría un rol en el mantenimiento de la T_3 sérica en ratas crónicamente intoxicadas. De forma opuesta se ha demostrado previamente que el TCDD, el compuesto tipo dioxina más tóxico existente, producía una disminución en la actividad de la 5' D-I hepática y un aumento en la actividad de la 5' D-II de TAM (Raasmaja y col. 1996). La disminución en la actividad de la 5' D-II del TAM podría estar regulado post-transcripcionalmente como surge de nuestros resultados que muestran que el contenido de RNAm de 5' D-II no se encontraba alterado por el HCB. Se ha demostrado que la inhibición de la 5' D-II de TAM por la T_4 y T_3 se debería a un aumento en la velocidad de desaparición de la enzima (Gereben y col., 2000). La disminución en la actividad de la 5' D-II del TAM se vió reflejada en una disminución de la concentración tisular de T_3 .

Otro factor regulatorio de la 5' D-II de TAM es la NA, pero dado que su concentración no varía en los animales intoxicados con HCB respecto de los

controles podemos sugerir que el efecto del pesticida no esta mediado por esta hormona.

Los resultados de este estudio sugieren que la mayor actividad total de la 5' D-I hepática, conjuntamente con la T₃ tiroidea en menor medida, contribuirían a mantener los niveles normales de T₃ circulante en ratas intoxicadas en forma crónica con HCB. A tiempos más cortos de intoxicación podrían intervenir otros mecanismos aún no elucidados. Estos resultados muestran que el mecanismo de acción del HCB sobre la homeostasis tiroidea es complejo y tejido específico. Al respecto, hemos demostrado previamente que el HCB aumenta la actividad de la enzima málica en hígado pero la disminuye en TAM (Kleiman de Pisarev y col., 1995; Alvarez L. y col., 2000).

Se ha sugerido que el hipotiroidismo de T₄ inducido por HCB, podría ser en parte consecuencia de una acelerada eliminación de T₄ debido a la inducción de la fenol UDPGT hepática (van Raij y col., 1993; Visser y col., 1993). Nuestros resultados muestran que la actividad de la UDPGT-T₄ aumentaba en forma dependiente del tiempo, sugiriendo que este mecanismo podría dar cuenta de la disminución de los niveles séricos de T₄. Sin embargo el hecho que la disminución de la T₄ sérica a los 3 días de intoxicación, es previa al aumento de la actividad de la UDPGT, sugiere que probablemente haya también otros mecanismos involucrados. El HCB no aumenta la actividad de la UDPGT- T₃, en concordancia con los niveles séricos de T₃ normales descriptos en nuestro trabajo.

En forma similar a lo que ocurre con el HCB, se ha demostrado que otros inductores de enzimas microsomales, tales como el 3-metilcolantreno y el Aroclor 1254 (PCB) aumentan la UDPGT-T₄ y reducen los niveles de T₄ total y libre circulantes (Barter y Klaasen, 1994; Liu y col., 1995).

Podemos afirmar que este trabajo es el estudio más completo hasta el presente sobre el rol del HCB sobre las actividades de las 5'-deiodinasas en ratas intoxicadas con HCB.

El análisis de la actividad de las 5'Deiodinasas del TAM y tiroides y del contenido de RNAm de UCP-1 en condiciones de estimulación por frío, nos permitiría esclarecer si el HCB afectaba la regulación normal de estos parámetros en estas condiciones.

Nuestros resultados demostraron como era de esperar, un aumento en la actividad basal de la 5'D-I de tiroides y 5'D-II de TAM en las ratas expuestas al frío. Del mismo modo las actividades de estas enzimas en ratas intoxicadas con HCB, aumentaban por exposición al frío comparadas con las actividades en termoneutralidad, demostrando que el tóxico no afectaba su regulación normal .

Siendo la UCP-1 un marcador fisiológico del TAM, analizamos el efecto del HCB sobre la expresión de la misma en condiciones de termoneutralidad y de exposición al frío. Se observó que el HCB no modificaba la expresión del gen de la UCP-1 en relación a sus controles en ambas condiciones de temperatura. Tanto en las ratas controles como en las intoxicadas se incrementaban los niveles de RNAm de UCP-1 por exposición al frío, verificándose de este modo que la regulación de la función termogénica no estaba alterada por el HCB.

La falta de efecto del HCB sobre los niveles de UCP-1 en termoneutralidad, era esperable dado que los dos principales factores que intervienen en la regulación del gen de la UCP-1, son la NA, que no se modifica en el TAM de las ratas intoxicadas, y la concentración de T₃ que disminuye levemente.

Experimentos previos de nuestro laboratorio evidenciaron que existe un aumento en los depósitos lipídicos del tejido adiposo marrón de ratas tratadas con HCB (Alvarez, 1997). Asimismo demostramos que este tóxico disminuye la actividad de

las enzimas lipogénicas generadoras de NADPH tales como la EM, la G6PD, así como la de LG3PD, tres enzimas hormono-tiroideo dependientes, siendo este efecto del HCB independiente de la presencia de hormonas tiroideas (Alvarez y col., 2000).

En este trabajo nos propusimos ampliar nuestros estudios acerca del efecto del HCB sobre el metabolismo lipídico en TAM. Las posibles fuentes de ácidos grasos para ser incorporados a los depósitos aumentados de triglicéridos observados en el TAM podrían provenir de la síntesis de los mismos, de la hidrólisis de triglicéridos circulantes, por la acción de la enzima LPL, y/o por una disminución en la actividad de la enzima lipasa hormono sensible (LHS) por el HCB.

Nuestros resultados mostraron que la actividad de la enzima Acetil-CoA carboxilasa, limitante de la velocidad de la síntesis de ácidos grasos no estaba modificada por el efecto del tóxico. Dado que la síntesis endógena de ácidos grasos no estaba alterada por la acción del pesticida, nos propusimos analizar la segunda ruta metabólica capaz de ingresar estos compuestos a la célula. Para ello medimos la actividad y el contenido de RNAm de la LPL. Nuestros resultados demostraron un aumento en la actividad de la misma, el cual estaría mediado por un mecanismo post-transcripcional dado que no se observaron modificaciones en los niveles de RNAm de la enzima. Dado que la actividad de la LPL está regulada por la NA en el TAM, y su concentración no se modifica por la administración de HCB, podemos sugerir que esta hormona no está involucrada en el mecanismo de acción del tóxico sobre la LPL. Como las concentraciones de triglicéridos séricos disminuyeron, ese parámetro no sería el responsable del incremento en la actividad de la LPL inducido por el HCB.

Los depósitos lipídicos intracelulares se acumulan en forma de triglicéridos. Una de las fuentes dadoras del esqueleto de los mismos para luego ser esterificado con ácidos grasos es el glicerol-3-fosfato proveniente principalmente de la glucosa sérica. Analizamos por ello la captación de glucosa y el contenido del

transportador GLUT-4 en el TAM de ratas tratadas con HCB.

Nuestros resultados mostraron, que la captación de glucosa aumentaba, al igual que el contenido del transportador. El aumento en el ingreso de glucosa no se debe a un aumento en los niveles séricos de insulina ya que estos no se modificaban por efecto del HCB. Estos datos sugieren que el aumento intracelular de glucosa junto con un mayor aporte de ácidos grasos por acción de la LPL podrían dar lugar al aumento del contenido lipídico observado histológicamente en el TAM de ratas intoxicadas.

Los estudios realizados en este trabajo de tesis son originales y los mas completos publicados en relación al efecto del HCB sobre la homeostasis de las hormonas tiroideas y sobre el metabolismo lipídico en TAM.

BIBLIOGRAFIA

Agius L, Williamson DH. The utilization of ketone bodies by the interscapular brown adipose tissue of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 666: 127-132, 1981.

Ahlborg, U.G., Lindgren, J.E. y Mercier, M. Metabolism of pentachlorophenol. *Arch. Toxicol.* 32: 271-281, 1974.

Ahlborg, U.G., Larsson, K., y Thunberg, T. Metabolism of pentachlorophenol in vivo and in vitro. *Arch. Toxicol.* 40: 45-53, 1978.

Alvarez L. Seminario de Licenciatura: Efecto del hexaclorobenzeno sobre la actividad de enzimas lipogénicas en el tejido adiposo marrón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1997.

Alvarez L, Randi A, Alvarez P, Kölliker-Frers R, Kleiman de Pisarev, DL. Effect of hexachlorobenzene on NADPH-generating lipogenic enzymes and L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue. *J. Endocr. Invest.* 22: 436-445, 1999.

Alvarez L., Randi A, Alvarez P, Piroli G, Chammsion-Reig A, Lux-Lantos V, Kleiman de Pisarev DL. Reproductive effects of hexachlorobenzene in female rats. *J. Appl. Toxicol* 20: 81-87, 2000.

Argyropoulos G, Brown AM, Willi SM, Zhu J, He Y, Reitman M, Gevao SM, Spruill I, Garvey WT. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the

respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 102: 1345-1351, 1998.

Argyropoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol.* 92: 2187-2198. Review, 2002.

Barter RE, , Klaassen CD. Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronyltransferase inducers in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 9-17, 1994.

Bates JM, Spate VL, Morris JS, St Germain DL, Galton VA. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology.* 7: 2490-2500, 1999.

Beetstra JB, Van Engelen JGM, Karels P, Van der Hoek HJ, De Jong M, Docter R, Krenning EP, Hennemann G, Brouwe A, Visser TJ. Thyroxine and 3,3',5-triiodothyronine are glucuronidated in rat liver by different uridine diphosphate-glucuronyltransferases. *Endocrinology.* 128: 741-746, 1991.

Bianco A , Silva JE. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J. Clinical Invest.* 79: 295-300, 1987.

Bianco AC, Carvalho SD, Carvalho CR, Rabelo R, Moriscot AS. Thyroxine 5'-deiodination mediates norepinephrine-induced lipogenesis in dispersed brown

adipocytes *Endocrinology*. 139: 571-578, 1998.

Billi de Catabbi S, Sterin-Speziale, N, Fernandez MC, Mimutolo C , San Martin de Viale LC. Time course of hexachlorobenzene-induced alteration of lipid metabolism and their relation to porphyria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 335-344, 1997.

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

Buckley MG, Rath EA. Regulation of fatty acid synthesis and malonyl-CoA content in mouse brown adipose tissue in response to cold-exposure, starvation or re-feeding. *Biochem. J.* 243: 437-442, 1987.

Brito MN, Brito NA, Brito SR, Moura MA, Kawashita NH, Kettelhut IC, Migliorini RH. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Am J Physiol.* 276: R1003-1009, 1999.

Bouillaud F, Weisenbach J, Ricquier D. Complete cDNA-derived aminoacid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 261: 1487-1490, 1986.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP. The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. Eur J Biochem. 206: 775-781, 1992.

Braun, W.H., Young, J.D., Blau, G.E. y Gehring, P.J. The pharmacokinetics and metabolism of pentachlorophenol in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41: 395-406, 1977.

Brucker-Davis, F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. Thyroid 8: 827-856, 1998.

Cabral, J.R.P., and Shubik, P. Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in mice and hamsters. In Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium. (Morris, C. R., and Cabral J.R.P. eds.), IARC Scientific Publications, Lyon, pag 411-416, 1986.

Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. Essays Biochem. 20: 110-164. Review, 1985.

Canonero R, Campart GB, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Testing of p-dichlorobenzene and hexachlorobenzene for their ability to induce DNA damage and micronucleus formation in primary cultures of rat and human hepatocytes. Mutagenesis. 12: 35-39, 1997.

CARP Comisión Administradora del Río de la Plata. Estudio para la evaluación de la Contaminación en el Río de la Plata. Advanced Report. Argentine Hydrographic Navy Service, Buenos Aires, 1989.

Carr FE, Seelig S, Mariash CN, Schwartz HL, Oppenheimer JH. Starvation and hypothyroidism exert an overlapping influence on rat hepatic messenger RNA activity profiles. *J Clin Invest.* 372: 154-163, 1983.

Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim. Biophys Acta.* 1154: 65-82, 1993.

Carvalho SD, Negrao N, Bianco AC. Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue. *Am J Physiol.* E874-81, 1993.

Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Chagnon M, Gelly C, Dionne FT, Oppert JM, Bouchard C, Chagnon Y, Ricquier D. The Bcl I polymorphism of the human uncoupling protein (ucp) gene is due to a point mutation in the 5'-flanking region. : *Int J Obes Relat Metab Disord.* 20: 278-279, 1996.

Chaufan G, Rios de Molina MC, San Martin de Viale LC. How does hexachlorobenzene treatment affect liver uroporphyrinogen decarboxylase?. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 621-630, 2001.

Chomczynski, P , Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid

guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.

Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest.* 25: 823-835. Review, 2002.

Collins S, O'Keeffe M, Smyth MR. Multi-residue analysis for beta-agonists in urine and liver samples using mixed phase columns with determination by radioimmunoassay. *Analyst.* 119: 2671-2674, 1994.

Combatsiaris TP, Charron MJ. Downregulation of uncoupling protein 2 mRNA in white adipose tissue and uncoupling protein 3 mRNA in skeletal muscle during the early stages of leptin treatment. *Diabetes.* 48: 128-133, 1999.

Conney AH, Jacobson M, Schneidman K, Kuntzman R. Induction of liver microsomal cortisol 6beta-hydroxylase by diphenylhydantoin or phenobarbital: an explanation for the increased excretion of 6-hydroxycortisol in humans treated with these drugs. *Life Sci.* 4: 1091-1098, 1965.

Corbalan MS, Margareto J, Martinez JA, Marti A. High-fat feeding reduced muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *J Physiol Biochem.* 55: 67-72, 1999.

Courtney, KD. Hexachlorobenzene: a review. *Environn. Res.* 20: 225-246, 1979.

Cripps DJ, Peters HA, Gocmen A, Dogramaci Y. Porphyria turcica due to hexachlorobenzene: A 20 to 30 year follow-up study on 204 patients. *Br J Dermatol.* 111: 413-422, 1984.

Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest.* 98: 405-417, 1996.

Curcio-Morelli C, Zavacki AM, Christofollete M, Gereben B, de Freitas BC, Harney JW, Li Z, Wu G, Bianco AC. Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. : *J Clin Invest.* 112: 189-196, 2003.

Danielson PE, Forss-Peter S, Brow MA, Calavetta L, Douglas J, Milnar RJ, Sutcliffe JG p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin, *DNA.* 7: 261-267, 1988.

De Herder WW, hazenberg MP, Pennock Schroeder AM, Oosterlaken AC, Rutgers M , Visser TJ. On the enterohepatic cycle of triiodothyronine in rats: Importance of the intestinal microflora. *Life Sci.* 45: 849-856, 1989.

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

De Potter WP, Partoens P, Strecker S. Noradrenaline storing vesicles in sympathetic neurons and their role in neurotransmitter release: an historical overview of controversial issues. *Neurochem Res.* 22: 911-919. Review, 1997.

Debets FM, Strik JJ, Olie K. Effects of pentachlorophenol on rat liver changes induced by hexachlorobenzene, with special reference to porphyria, and alterations in mixed function oxygenases. *Toxicology.* 15: 181-195, 1980.

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

Den Besten C, Bennik MH, Bruggeman I, Schielen P, Kuper F, Brouwer A, Koeman JH, De Felip E, di Domenico A, Miniero R, Silvestroni L. Polychlorobiphenyls and other organochlorine compounds in human follicular fluid. *Chemosphere.* 54: 1445-1449, 2004.

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

Derry DM, Schonbaum E, Steiner G. Two sympathetic nerve supplies to brown adipose tissue of the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 47: 57-63, 1969.

Diamant S, Gorin E, Shafir E. Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine. *Eur J Biochem.* 26: 553-959, 1972.

Diekman MJ, Tinnemans JG, Wiersinga WM. rise of a submerged goiter. *Thyroid.* 10: 1015-1016, 2000.

Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, Tegos K, Challiss RA, Wegener G, Newsholme EA. The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Clin Invest.* 27: 475-483, 1997.

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

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

Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol.* 260: R328-334, 1991.

Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not

obese. *Nature*. 387: 90-94, 1997.

Erickson VJ, Cavalieri RR, Rosenberg LL. Thyroxine-5'-deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotropin. *Endocrinology* 111: 434-440, 1982.

Everts ME, Visser TJ, Moerings EP, Docter R, van Toor H, Tempelaars AM, de Jong M, Krenning EP, Hennemann G. Uptake of triiodothyroacetic acid and its effect on thyrotropin secretion in cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology*. 135: 2700-2707, 1994.

Fisher, J.M., Jones, K.W. y Whitlock, J.P. Jr. Activation of transcription as a general mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Mol. Carcinog.* 1: 216-221, 1989.

Foster WG, Pentick JA, McMahon A, Lecavalier PR. Ovarian toxicity of hexachlorobenzene (HCB) in the superovulated female rat. *J Biochem Toxicol.* 7: 1-4, 1992.

Foster WG, McMahon A, Villeneuve DC, Jarrell JF. Hexachlorobenzene (HCB) suppresses circulating progesterone concentrations during the luteal phase in the cynomolgus monkey. *J Appl Toxicol.* 12: 13-17, 1992.

Foster WG, Pentick JA, McMahon A, Lecavalier PR. Body distribution and endocrine toxicity of hexachlorobenzene in the female rat. *Journal of Applied*

Toxicology. 13: 79-83, 1993.

Frank R, Braun HE, Sirons GH, Rasper J, Ward GG. Organochlorine y organophosphorous insecticides y industrial pollutants in the milk supplies of Ontario-. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 48: 499-504, 1985.

Freake HC, Schwartz HL, Oppenheimer JH. The regulation of lipogenesis by thyroid hormone and its contribution to thermogenesis. Endocrinology. 125: 2868-2874, 1989.

Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulicier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M. Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. : Int J Obes Relat Metab Disord. 20: 1051-1054, 1996.

Galitzky J, Reverte M, Carpene C, Lafontan M, Berlan M. Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. J Pharmacol Exp Ther. 266: 358-366, 1993.

García-Jimenez C, Hernández A, Obregón MJ, Santisteban P. Malic enzyme gene expression in differentiating brown adipocytes: regulation by insulin and triiodothyronine. Endocrinology. 132: 157-163, 1993.

Garrido, M.D. Niveles de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en leches esterilizadas españolas. Estudio experimental del efecto de la temperatura

sobre estos compuestos. Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary. University of Córdoba, 1990.

Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol.* 14: 1697-1708, 2000.

Gnoni GV, Landriscina C, Quagliariello E. Fatty acid biosynthesis in adipose tissue and lung subcellular fractions of thyrotoxic rats. : *FEBS Lett.* 122: 37-40, 1980.

Goglia F, Liverini G, Lanni A, Iossa S, Barletta A. Effects of 3,5,3'-triiodothyronine (T3) on rat liver peroxisomal compartment during cold exposure. *Exp Biol.* 48: 135-140, 1989.

Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M.. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem.* 272: 24129-24132, 1997.

Goodridge AG. Regulation of the gene for fatty acid synthase. *Fed Proc.* 45: 2399-2405, 1986.

Gregory RB, Berry MN. The influence of thyroid state on hepatic glycolysis. *Eur J Biochem.* 229: 344-348, 1995.

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

Gripois D, Valens M. Uptake and turnover rate of norepinephrine in interscapular brown adipose tissue of the young rat. Influence of hypothyroidism. *Biol Neonate*. 42: 113-119, 1982.

Hafner RP, Nobes CD, McGown AD, Brand MD. Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. : *Eur J Biochem*. 178: 511-518,1988.

Hafner RP, Brown GC, Brand MD. Thyroid-hormone control of state-3 respiration in isolated rat liver mitochondria. *Biochem J*. 265: 731-734, 1990.

Hahn, M.E., Goldstein, J.A., Linko, P., y Gasiewicz, T. Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. *Arch. Biochem. Biophys*. 270: 344-355, 1989.

Himms-Hagen J. Defective brown adipose tissue thermogenesis in obese mice. : *Int J Obes*. 9: 17-24, 1985.

Himms-Hagen J. Food restriction increases torpor and improves brown adipose tissue thermogenesis in ob/ob mice. *Am J Physiol.* 248: E531-539, 1985.

Himms-Hagen J, Hogan S, Zaror-Behrens G. Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (ob/ob) mice fed a palatable diet. *Am J Physiol.* 250: E274-281, 1986.

Iskan, M., Coban, T., Cok, I., Bulbul, D., Eke, B.C., Burgaz, S. The organochlorine pesticide residues and antioxidant enzyme activities in human breast tumors: is there any association?. *Breast Cancer Res Treat.* 72: 173-182, 2002.

Iossa S, Liverini G, Barletta A. Effect of thyroid state and cold exposure on rat liver mitochondrial protein mass and function. *J Endocrinol.* 131: 67-73, 1991.

Kandror KV. A long search for Glut4 activation. *Sci STKE.* 169: PE5, 2003.

Kleiman de Pisarev DL, Sancovich HA, , Feramola de Sancovich AM. Enhanced thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-intoxicated rats. *J.Endocrinol. Invest.* 12: 767-772, 1989.

Kleiman de Pisarev D.L., Ríos de Molina M. del C. , San Martín de Viale L.C. Thyroid function and thyroxine metabolism in hexachlorobenzene- induced porphyria . *Biochemical Pharmacology, USA,* 39: 817-825, 1990.

Kleiman de Pisarev D. L., Sancovich H., Ferramola de Sancovich A. Hepatic indices of thyroid status in rats treated with hexachlorobenzene. *J.Endocrinolog. Invest.* 18: 271-276, 1995.

Koss G , Koransky W. Studies on the toxicology of hexachlorobenzene I. Pharmacokinetics. *Arch. Toxicol.* 34: 265-275, 1975.

Krawiec L, Chester HA, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, Pisarev MA. Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates and iodide at the cell membrane level. *Horm Metab Res.* 23: 321-325, 1991.

LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid.* 9: 735-740. Review, 1999.

Lambrecht RW, Ertuck E, Gruden EE, Peters HA, Morris CR, Bryan GT. Hepatic carcinogenicity of chronically administered hexachlorobenzene in rats. *Fed. Proc.* 42: 786, 1986.

Laureberg P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metab. Clin. Exp.* 33: 379-392, 1984.

Laureberg P Thyroxine entering the thyroid via the vascular bed may leave the gland as triiodothyronines. Studies with perfused dog thyroid lobes. *Endocrinology.* 118: 895-900, 1986.

Leonard JL , Rosenberg IN . Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology*. 107: 1376-1383, 1980.

Leonard JL, Mellen SA, Larsen PR. Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue. : *Endocrinology*. 112: 1153-1155, 1983.

Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience*. 115: 879-889, 2002.

Liu J, Liu Y, Barter RA , Klaassen CD. Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 977-985, 1995.

Loaiza A, Seisedos MT, Kleiman de Pisarev DL, Sancovich HA, Randi A, Ferramola de Sancovich A.M. , Santisteban P. Hexachlorobenzene , a Dioxine-type compound, increases malic enzyme gene transcription through a mechanism involving the thyroid hormone response element. *Endocrinology*. 140: 4142-4151, 1999.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.

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

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. In: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

Manual de Plaguicidas, Guía para América Central. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Costa Rica, 1999.

Masson,. Diccionario terminológico de ciencias medicas. Directrices para lucha contra intoxicaciones, OMS -PNUMA - OIT, 1992.

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

Mazzetti MB, Taira MC, Lelli SM, Dascal E, Basabe JC, de Viale LC. Hexachlorobenzene impairs glucose metabolism in a rat model of porphyria cutanea tarda: a mechanistic approach. *Arch Toxicol.* 78: 25-33, 2004.

McCormack JG. The regulation of fatty acid synthesis in brown adipose tissue by insulin. *Prog Lipid Res.* 21: 195-223, 1982.

McCarthy HD, Kilpatrick AP, Trayhurn P, Williams G. Widespread increases in regional hypothalamic neuropeptide Y levels in acute cold-exposed rats. *Neuroscience*. 54: 127-132, 1993.

Meironyte Guvenius D, Bergman A, Noren K. Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Arch Environ Contam Toxicol*. 40: 564-570, 2001.

Messier N, Laflamme L, Hamann G, Langlois MF. In vitro effect of Triac on resistance to thyroid hormone receptor mutants: potential basis for therapy. *Mol Cell Endocrinol*. 28: 59-69, 2001.

Miners JO, Mackenzie PI. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther*. 51: 347-369. Review, 1991.

Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S. Specific accumulation and elimination kinetics of tris(4-chlorophenyl)methane, tris(4-chlorophenyl)methanol, and other persistent organochlorines in humans from Japan. *Environ Health Perspect*. 109: 927-935, 2001.

Monemdjou S, Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial proton leak in brown adipose tissue mitochondria of Ucp1-deficient mice is GDP insensitive. *Am J Physiol*. 276: E1073-82, 1999.

Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F, Obregón MJ Thyroid

hormons in tissues from fetal and adult rats. *Endocrinology* 134: 2410-2415. 1994.

Morreale de Escobar G, Pastor RM, Obregón MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues. *Endocrinology*. 117: 1890-1901, 1985.

Morse DC, Groen D, Veerman M, van Amerongen CJ, Koeter HB, Sits van Prooije AE, Visser TH, Koeman JH , Brouwer A. Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 122: 27-33, 1993.

Morse DC, Wehler EK, Wesseling W, Koeman JH , Brouwer. Alterations in rat brain thyroid hormone status following pre-and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol Appl. Pharmacol.* 136: 269-279, 1996.

Nebert DW. Multiple forms of inducible drug-metabolizing enzymes: a reasonable mechanism by which any organism can cope with adversity. *Mol Cell Biochem.* 27: 27-46, 1979.

Norman D, Mukherjee S, Symons D, Jung RT, Lever JD. Neuropeptides in interscapular and perirenal brown adipose tissue in the rat: a plurality of innervation. *J Neurocytol.* 17: 305-311, 1988.

Obregón MJ, Morreale de Escobar G., Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium

tecnicue. *Endocrinology*. 103: 2145-2153, 1978.

Obregon MJ, Mallol J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. presence of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in tissues from thyroidectomized rats. *Endocrinology*. 109: 908-918, 1981.

Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Hernández A, Calvo R, Escoba del Rey F, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue during fetal life. *Am. J. Physiol*. 257: E625-E631, 1989.

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

Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard C. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 18: 526-531, 1994.

Pazos-Moura CC, Moura RG, Dorris ML, Rehnmark S, Melendez L, Silva JE, Taurog A. Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues. *Am. J. Physiol*. 260 (Endocrinol. Metab. 23), E175-E182, 1991.

Peters HA, Goiman A, Cripps DJ, Bryon GF, Dogramaci, I. Epidemiology of Hexachlorobenzene induced porphyria in Turkey. *Arch. Neurol*. 39: 744-749,

1987.

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

Pohjanvirta R, Tuomisto L, Tuomisto J. The central nervous system may be involved in TCDD toxicity. Toxicology. 58: 167-74, 1989.

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

Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. Int J Obes Relat Metab Disord. Suppl. 2: S109-12. Review, 2000.

Raasmaja A, Viluksela M, Rozman KK. Decreased liver type I 5'-deiodinase and increased brown adipose tissue type II 5'-deiodinase activity in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-0-dioxin (TCDD)-treated Long-Evans rats. Toxicology. 114: 199-205, 1996.

Revelli JP, Pescini R, Muzzin P, Seydoux J, Fitzgerald MG, Fraser CM, Giacobino JP. Changes in beta 1- and beta 2-adrenergic receptor mRNA levels in brown adipose tissue and heart of hypothyroid rats. Biochem J. 277: 625-629, 1991.

Ribas-Fito N, Sunyer J, Sala M, Grimalt JO. Changes in concentrations of organochloride compounds in women from Flix, Tarragona [Spain]. *Gac Sanit.* 17: 309-311, 2003.

Richard D, Clavel S, Huang Q, Sanchis D, Ricquier D. Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem Soc Trans.* 29: 812-817, 2001.

Ricquier D. To burn or to store : *Ann Endocrinol (Paris)*. 63: S7-14, 2002.

Roland, Koenig RJ. Ubiquitinated deiodinase: not dead yet. *J Clin Invest.* 112: 145-147, 2003.

Roth WL, Freeman RA, Wilson AG. A physiologically based model for gastrointestinal absorption and excretion of chemicals carried by lipids. *Risk Anal.* 13: 531-543, 1993.

Rozman K, Gorski JR, Rozman P, Parkinson A. Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene induced porphyria. *Toxicol. Lett.* 30: 71, 1986.

Rozman K, Greim H. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cold-adapted rats. *Arch Toxicol.* 59: 211-215, 1986.

Ruiz de Oña C, Morreale de Escobar G, Calvo RM, Escobar del Rey F, Obregón MJ. Thyroid hormone and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology*. 128: 422-432. 1991

Sagnol M, Claustre J, Cotte t- Emard JM, Pequignot JM, Fellmann N, Coudert J, Peyrin L. Plasma free and sulphated catecholamines after ultra-long exercise and recovery. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 60: 91-97, 1990.

Salter AM, Hayashi R, al-Seeni M, Brown NF, Bruce J, Sorensen O, Atkinson EA, Middleton B, Bleackley RC, Brindley DN. Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities in rat liver. *Biochem J*. 276 : 825-32, 1991.

Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL, Visser TJ. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology*. 140: 3666-3673, 1999.

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

Schmidt JV, Bradfield CA. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12: 55-89, 1996.

Schrauwen P, Hinderling V, Hesselink MK, Schaart G, Kornips E, Saris WH, Westerterp-Plantenga M, Langhans W. Etomoxir-induced increase in UCP3 supports a role of uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J.* 16: 1688-1690. 2002.

Schreiber G, Southwell BR, Richardson SJ. Hormone delivery systems to the brain-transthyretin. *Exp. Clin. Endocrinol.* 103: 75-80, 1995.

Seydoux J, Ricquier D, Rohner-Jeanreanaud F, Assimacopoulos-Jeannet F, Giacobino JP, Jeanreanaud B, Girardier L. Decreased guanine nucleotide binding and reduced equivalent production by brown adipose tissue in hypothalamic obesity. Recovery after cold acclimation. *FEBS Lett.* 146: 161-164, 1992.

Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH. Induction of uncoupling protein-2 mRNA by troglitazone in the pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 237: 359-361, 1997.

Shimizu Y, Satoh S, Yano H, Minokoshi Y, Cushman SW, Shimazu T. Effects of noradrenaline on the cell-surface glucose transporters in cultured brown adipocytes: novel mechanism for selective activation of GLUT1 glucose transporters. *Biochem J.* 330: 397-403, 1998.

Silva JE., Leonard JL., Crantz FR., Larsen PR. Evidence for two tissue-specific pathways for in vivo thyroxine 5'-deiodination in the rat. *J Clin Invest.* 69: 1176-1184, 1982.

Silva JE, Gordon MB, Crantz FR, Leonard JL, Larsen PR. Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal T3 generation between euthyroid and hypothyroid rats. *J.Clin. Invest.* 73: 898-907, 1984.

Silva JE , Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J.Clin. Invest.* 76: 2296-2302, 1985.

Silva JE, Larsen PR. Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. *J Clin Invest.* 77: 1214-23, 1986.

Simonides WS, van der Linden GC, van Hardeveld C. Thyroid hormone differentially affects mRNA levels of Ca-ATPase isozymes of sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle. *FEBS Lett.* 274: 73-76, 1990.

Smith AG, Dinsdale D, Cabral JRP, Wright AL. Goitre and wasting induced in hamster by hexachlorobenzene. *Arch. Toxicol.* 60: 343-349, 1987.

Sopena de Kracoff Y, Ferramola de Sancovich A.M, Sancovich HA , Kleiman de Pisarev DL Effect of thyroidectomy and thyroxine on hexachlorobenzene induced porphyria. *J. Endocrinolog. Investig.*17: 301-305, 1994 .

St Germain DL, Adler RA, Galton VA. Thyroxine 5'-deiodinase activity in anterior

pituitary glands transplanted under the renal capsule in the rat. *Endocrinology*. 117: 55-63, 1985.

St Germain DL, Galton VA. Comparative study of pituitary-thyroid hormone economy in fasting and hypothyroid rats. : *J Clin Invest*. 75: 679-688, 1985.

St Germain DL. Metabolic effect of 3,3',5'-triiodothyronine in cultured growth hormone-producing rat pituitary tumor cells. Evidence for a unique mechanism of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 76: 890-893, 1985.

St Germain DL, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, Galton VA. A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. : *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 7767-7771, 1994.

St Germain B, Houlihan N, D'Amato S. Dimethyl sulfoxide therapy in the treatment of vesicant extravasation: two case presentations. *J Intraven Nurs*. 17: 261-266, 1994.

Sullo A, Brizzi G, Maffulli N. Serotonin effect on deiodinating activity in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 81: 747-751, 2003.

Thelen MH, Muller A, Zuidwijk MJ, van der Linden GC, Simonides WS, van Hardeveld C. Differential regulation of the expression of fast-type sarcoplasmic-reticulum Ca(2+)-ATPase by thyroid hormone and insulin-like growth factor-I in the L6 muscle cell line. *Biochem J*. 303 :467-474, 1993

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. : *Biotechnology*. 24: 145-149, 1992.

Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J*. 311: 729-733, 1995.

Urhammer SA, Moller AM, Nyholm B, Ekstrom CT, Eiberg H, Clausen JO, Hansen T, Pedersen O, Schmitz O. The effect of two frequent amino acid variants of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene on estimates of the pancreatic beta-cell function in Caucasian glucose-tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. : *J Clin Endocrinol Metab*. 83: 3992-3995, 1998.

Van Liefde I, Van Witzenburg A, Vauquelin G. Multiple beta adrenergic receptor subclasses mediate the l-isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 262: 552-558, 1992.

van Raaij JAGM, Van den Berg KJ, Noten WR. Hexachlorobenzene and its metabolites pentachlorophenol and tetrachlorohydroquinone: interaction with thyroxine binding sites of rat thyroid hormone carriers ex vivo and in vitro. *Toxicol lett*. 59: 101-107, 1991.

van Raaij JAGM, Kaptein E, Visser TJ, van den Berg K.J. Increased

glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene-treated rats. *Biochem. Pharmacol.* 45: 627-631, 1993.

Vega-Nunez E, Alvarez AM, Menendez-Hurtado A, Santos A, Perez-Castillo A. Neuronal mitochondrial morphology and transmembrane potential are severely altered by hypothyroidism during rat brain development. *Endocrinology.* 138: 3771-3778, 1997.

Visser TJ, Kaptein E, van Toor H, van Raaij JA, van den Berg KJ, Joe CT, van Engelen JG y Brouwer A. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: Effects of in vitro treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology.* 133: 2177-2186, 1993.

Visser TJ, van Haasteren GA, Linkels E, Kaptein E, van Toor H, de Greef WJ. Gender-specific changes in thyroid hormone-glucuronidating enzymes in rat liver during short-term fasting and long-term food restriction. *Eur J Endocrinol.* 135: 489-497, 1996.

Wahrenberg H, Engfeldt P, Arner P, Wennlund A, Ostman J. Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: findings in hyper- and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 63: 631-638, 1986.

Weber LW, Haart TW, Rozman K. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thermogenesis in brown adipose tissue of rats. *Toxicol Lett.* 39: 241-248, 1987.

WHO . Evaluation of some pesticides residues in food. WHO Pesticide Residues Series 4. Geneva, 1974.