



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPOSICIÓN PRENATAL A CADMIO Y RETARDO DE  
CRECIMIENTO INTRAUTERINO EN UN MODELO  
ROEDOR.**

**MANUEL URRUTIA MESSINA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la  
Producción Animal.

**PROFESOR GUÍA: DRA. ANA MARIA RONCO.**

**SANTIAGO, CHILE**

**2009**

## Índice

	Página
Resumen y Abstract.	3
Introducción	6
Revisión Bibliográfica	8
- Efectos Biológicos	8
- Bajo peso de nacimiento y reprogramación fetal	10
- Factores hormonales que afectan el peso de nacimiento: Glucocorticoides	11
- Mecanismo de acción de glucocorticoides	12
- Importancia de la placenta en la regulación de los glucocorticoides	12
Hipótesis y Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
- Modelo de estudio	14
- Extracción y almacenamiento de las muestras	18
- Determinación de concentración de cadmio	18

- Determinación de las concentraciones de corticosterona	19
- Actividad enzimática de 11 $\beta$ -HSD2	23
- Potencial reproductivo F1	28
- Análisis estadístico	30
Resultados	31
- Características de las madres	31
- Determinación de la concentración de cadmio	33
- Características de los fetos	34
- Concentración de corticosterona	37
- Actividad enzimática	38
- Potencial reproductivo de F1	38
Discusión	41
Conclusiones	49
Bibliografía	50
Anexo: Carta Comité Bioética Animal INTA	55

## Resumen

Se ha demostrado que los hijos de madres que fuman durante el embarazo tienen menor peso de nacimiento (PN) en comparación con las mujeres no fumadoras. Entre los elementos tóxicos del tabaco se encuentra el cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), importante contaminante ambiental con efectos tóxicos demostrados para la población humana y animal. Existe además una correlación entre niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  placentarios y PN lo que sugiere una relación entre PN y  $\text{Cd}^{2+}$ . Sin embargo, se desconoce los mecanismos involucrados.

Estudios *in-vitro* en cultivos de trofoblastos de placenta humana demostraron que  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe a la enzima placentaria  $11\beta\text{-HSD2}$ , encargada de la inactivación de los glucocorticoides. Una adecuada actividad de la  $11\beta\text{-HSD2}$  protege al feto del exceso dañino de glucocorticoides (GC), en consecuencia, una disminución de esta enzima aumenta la exposición del feto a GC disminuyendo su PN. Por otro lado se ha demostrado que los GC estimulan la actividad de la  $11\beta\text{-HSD2}$  promoviendo así su propia inactivación.

Nosotros postulamos que una exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  durante la gestación, induce bajo PN mediado por un aumento en los niveles de glucocorticoides, debido a una disminución en la actividad enzimática placentaria de la  $11\beta\text{-HSD2}$ . El tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  induciría también efectos reproductivos en las crías hembras en la edad adulta.

El modelo de estudio fue la rata Wistar, hembras de esta cepa fueron cruzadas y tratadas durante toda la gestación con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  (5, 10, 30 y 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$ ) en el agua de bebida. Al día 20 de gestación las crías fueron extraídas por cesárea y se determinó peso y talla de los fetos y peso de placentas. También se extrajeron muestras de sangre y tejidos para las mediciones de  $\text{Cd}^{2+}$  (medidos por espectrometría de absorción atómica: AAS), glucocorticoides (específicamente corticosterona, el GC activo en roedores, determinados por ELISA) y la actividad enzimática de  $11\beta\text{-HSD2}$  (determinada por un ensayo radiométrico).

Los resultados indican una acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en tejido placentario la que es dependiente de la dosis de  $\text{Cd}^{2+}$  utilizada. Sólo la dosis de 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  indujo una leve pero significativa reducción del PN la que fue concomitante con un aumento en los niveles de corticosterona materna, fetal y placentaria, pero sin alteraciones en la actividad de la  $11\beta\text{-HSD2}$  placentaria.

Se concluye que la exposición prenatal a 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  induce una disminución del PN de las crías, efecto mediado en parte por una exposición fetal aumentada a corticosterona la que no es adecuadamente inactivada a nivel placentario, probablemente, por el daño a nivel del tejido placentario producido por la acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$ . Los parámetros reproductivos evaluados permiten concluir que la fertilidad de las hembras tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  durante la gestación se encuentra disminuida.

### **Abstract**

It has been demonstrated that children from mothers who smoke during pregnancy have lower birth weight compared to non-smokers. Cadmium is among several toxic elements contained in cigarette smoke, which is an important environmental toxicant with demonstrated toxic effects in human and animal populations. In addition, it has been demonstrated the existence of a correlation between placental  $\text{Cd}^{2+}$  levels and birth weight, suggesting a relationship between birth weight and  $\text{Cd}^{2+}$ . However, involved mechanisms are at present unknown.

*In vitro* studies with cultured human placental trophoblasts have demonstrated that  $\text{Cd}^{2+}$  inhibits  $11\beta$ -HSD2 placental activity, enzyme responsible of inactivating active glucocorticoids. An adequate  $11\beta$ -HSD2 activity protects the foetus of deleterious high levels of glucocorticoids (GC). As consequence, a decreased  $11\beta$ -HSD2 activity increase foetal exposure to GC decreasing birth weight. On the other hand, it has been demonstrated that GC stimulate  $11\beta$ -HSD2 activity gathering its own inactivation.

We postulated in this study, that a  $\text{Cd}^{2+}$  exposure during gestation induces low birth weight through increased levels of GC due to a decreased enzymatic activity of placental  $11\beta$ -HSD2. The treatment with  $\text{Cd}^{2+}$  may also induce deleterious reproductive effects on female offspring at adult age.

The study model was the Wistar rat. Virgin adult females were mated and treated during the whole pregnancy period to different concentrations of  $\text{CdCl}_2$  (5, 10, 30 y 50 ppm of  $\text{Cd}^{2+}$ ) in the drinking water. At day 20 of gestation, offspring were extracted by a caesarean and foetal birth weight and size, and placental weight was registered. Also, blood and tissues samples were collected for the measurements of  $\text{Cd}^{2+}$  (determined by AAS) GC (specifically corticosterone, the main GC in rodents, determined by EIA) and enzymatic activity of  $11\beta$ -HSD2 (determined by a radiometric assay).

Results indicate an accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  in placental tissues which is dependant of the different  $\text{Cd}^{2+}$  dose utilized in the treatments. Just 50 ppm of  $\text{Cd}^{2+}$  were able to induce a mild but significant reduction in birth weight, concomitant with increased maternal and foetal corticosterone levels, although without significant changes of placental  $11\beta$ -HSD2 activity.

It is concluded that prenatal exposure to 50 ppm of  $\text{Cd}^{2+}$  induces a reduction in offspring birth weigh, an effects mediated in part by higher foetal exposure to corticosterone levels which are not being adequately inactivated at placental level, probably, due to the generalized placental damage produced by  $\text{Cd}^{2+}$ . The reproductive parameters evaluated in the present study indicate that fertility capacity of females treated with  $\text{Cd}^{2+}$  during pregnancy are diminished.

## Introducción

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un metal pesado que se encuentra ampliamente difundido en el ambiente, debido a la polución de diferentes fuentes, como la minería, baterías, pigmentos, plásticos, etc. Puede ser absorbido por vía digestiva y respiratoria. Se encuentra en varios alimentos pero en concentraciones bajas, aunque la mayor fuente de exposición en la población es el humo de tabaco.

Se ha descrito varios efectos tóxicos del  $\text{Cd}^{2+}$  en seres humanos y otras especies animales incluyendo efectos reproductivos y cancerígenos. Se ha observado que madres fumadoras tienen hijos de menor PN que los hijos de madres no fumadoras. Aún no se conoce qué efectos a largo plazo y cuáles mecanismos estarían implicados en el bajo PN de los hijos de madres que consumen tabaco durante la gestación.

El objetivo de este estudio es demostrar que la exposición prenatal a  $\text{Cd}^{2+}$  produce una acumulación en la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  placentario, lo que alteraría el metabolismo de varias hormonas entre las cuales se encuentran los GC, importantes reguladores del crecimiento y desarrollo fetal.

El aumento de GC activos durante la gestación está relacionado positivamente con el retardo de crecimiento intrauterino (RCIU), en consecuencia, es de esperar que la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  afecte el crecimiento y desarrollo fetal por un mecanismo mediado por GC. A su vez el RCIU se ha asociado a una serie de enfermedades no transmisibles que se expresan en la vida adulta como enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, insulina resistencia, etc., lo que se ha denominado reprogramación fetal (RF).

La RF se entiende como la readecuación fisiológica del feto como consecuencia de una alteración en el ambiente materno durante una etapa sensible del desarrollo fetal, debido a un estrés nutricional u hormonal como consecuencia entre otras, de la exposición a algún contaminante de forma crónica. En consecuencia, podemos sugerir que la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  durante la preñez puede ser considerada un potencial factor indirecto de RF.

La alteración del metabolismo de GC por  $\text{Cd}^{2+}$  se ha evidenciado en estudios recientes en los cuales se ha demostrado que  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe *in vitro* la expresión de la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ -HSD). Esta enzima, abundante en la placenta de

vertebrados, es la responsable de la inactivación de los GC, regulando así la exposición del feto a estas hormonas. En consecuencia, una inhibición de la expresión o actividad de esta enzima se traduce en una exposición aumentada del feto a GC, lo que afectaría el crecimiento y desarrollo fetal conduciendo a RCIU.

En este trabajo nos interesa estudiar, en un modelo de roedor, si la exposición a este metal durante la gestación, produce su acumulación en placenta, induciendo RCIU en las crías, como consecuencia de un aumento en los GC placentarios a través de un mecanismo asociado a la inhibición de la enzima  $11\beta$ -HSD.

## Revisión bibliográfica

### Generalidades

Los metales pesados son contaminantes medio-ambientales que provienen de varias fuentes; muchos de ellos producen una serie de efectos nocivos para los seres vivos. Han sido utilizados para un sin fin de tareas a lo largo de los siglos, como minería, metalurgia, industria química, etc. De estos contaminantes, los de mayor riesgo son:  $\text{Cd}^{2+}$ , plomo, mercurio y arsénico. Estos metales han sido amplia y regularmente estudiados por distintas organizaciones de salud. Cabe señalar que aunque sus efectos nocivos son conocidos desde hace muchos años, la exposición a ellos continúa e incluso se ha incrementado en algunos países, especialmente los subdesarrollados, aunque los países del primer mundo han disminuido sus emisiones a lo largo de los últimos 100 años (Järup, 2003).

El  $\text{Cd}^{2+}$  se encuentra en la naturaleza junto con zinc, plomo y cobre, pero la mayor fuente de contaminación es la antropogénica, siendo usado como estabilizadores de PVC, pigmentos, agentes anticorrosivos, fertilizantes, baterías recargables, etc (Kaltenecker y Waissmann, 2006). Fuentes de exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  no ocupacional son: la polución del aire, en ciertas zonas con alta industrialización o en terrenos donde hay altas concentraciones de este metal; también se encuentra en algunos alimentos, especialmente vegetales, en algunos países el arroz es una fuente importante de exposición; pero la mayor fuente de exposición en la población es el humo de tabaco. Diversos estudios demuestran que el hábito de fumar aumenta considerablemente los niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  plasmáticos, siendo hasta 4-5 veces mayores que en personas no fumadoras (Järup, 2003; Hogervorst y cols, 2006). La planta de tabaco pertenece a la familia de las Solanáceas, al igual que el tomate, este grupo de plantas poseen una alta capacidad para fijar  $\text{Cd}^{2+}$  desde el suelo (Soltis y cols, 2005).

### Efectos Biológicos.

El  $\text{Cd}^{2+}$  puede ser absorbido tanto por vía digestiva como respiratoria, siendo esta última vía la de mayor importancia en cuanto a salud pública (inhalación del humo de tabaco). Se le han descrito diversos efectos tóxicos en los organismos vivos (seres humanos y otras especies animales), tales como cancerígenos, teratogénicos y reproductivos. Este metal además tiene una

larga vida media en los organismos vivos (15 a 30 años), acumulándose en distintos órganos, como hígado, riñón, ovario, testículos y placenta (Wier y Miller, 1987).

En estudios de laboratorio, la  $DL_{50}$  oral para ratas es de 88 mg/kg de cloruro de  $Cd^{2+}$  ( $CdCl_2$ ) y el NOAEL (Non Observed Adverse Effects Level) para una exposición crónica en el agua de bebida es de 0,005 mg de Cd/Kg/día. (Flaigs y cols, 2003)

La exposición prolongada a este metal pesado puede llevar a daño renal, siendo el primer signo la disfunción tubular, la que puede ser reversible o irreversible dependiendo de la dosis de  $Cd^{2+}$  recibida y al tiempo de exposición (Järup, 2003). Esta disfunción tubular puede progresar a daño renal y la consiguiente disminución en la tasa de filtración glomerular, lo cual ya se ha reportado en trabajadores expuestos a  $Cd^{2+}$  (Fernández y cols, 2003). Experimentalmente se ha reproducido el daño renal por  $Cd^{2+}$ , en este órgano se acumula y aumenta el estrés oxidativo (Suru, 2008). También se describe en intoxicaciones crónicas con  $Cd^{2+}$  ototoxicidad, sin embargo el órgano blanco para este metal pesado sería principalmente el riñón (Kim y cols, 2008).

Se sabe que existe una susceptibilidad diferente en hombres y mujeres a este metal, siendo mayores sus efectos tóxicos en la mujer, especialmente durante la etapa de gestación. Se han encontrado mayores niveles de  $Cd^{2+}$  tanto en plasma como en orina en mujeres que en hombres frente a iguales dosis de exposición (Vahter y cols, 2007). La razón de esto podría deberse a la alta afinidad del transportador de metales divalentes duodenal (DMT1) por  $Cd^{2+}$ ; este transportador es el encargado del transporte de hierro y aumenta su actividad durante la preñez (Vahter y cols, 2007). En exposiciones prolongadas a este metal se presentan también daños en el sistema óseo de los individuos, como osteomalacia y osteoporosis, sobre todo en mujeres (Järup, 2003; Vahter y cols, 2007). En hombres, se ha encontrado una relación entre  $Cd^{2+}$  e infertilidad, existiendo una mayor concentración de este metal en suero y plasma seminal de hombres infértiles (Akinloye y cols, 2006).

Perturba la biodisponibilidad de elementos traza (como hierro), durante la gestación, esto tanto en el feto como en la madre, afectando de este modo la nutrición del feto (Piasek y cols, 2001). También se le describen importantes efectos teratogénicos en estudios *in-vivo* con ratones gestantes, donde altas dosis de  $Cd^{2+}$  provocaron serios daños en el DNA de los embriones, aumentando la apoptosis y también produciendo una disminución del PN de las crías (Fernández y cols, 2003).

El  $Cd^{2+}$  se ha clasificado como un cancerígeno humano, con evidencia tanto en humanos como en animales experimentales; ésto podría deberse a algún daño a nivel de DNA, lo que se apoya con evidencia *in-vitro*, donde a elevadas concentraciones de  $Cd^{2+}$  se altera la metilación del DNA y se induce un aumento de la apoptosis; mecanismos involucrados en el efecto carcinogénico del  $Cd^{2+}$  (Huang y cols, 2008).

Se reconoce al  $Cd^{2+}$  como un disruptor endocrino (*endocrine disruptor*), término que se aplica a los agentes químicos naturales o sintéticos capaces de imitar, estimular, o inhibir la acción endógena de las hormonas (Henson y Chedrese, 2004). A bajas dosis puede tener efectos similares a algunas hormonas esteroidales como estrógenos y andrógenos, efectos mediados por la estimulación de varias señales celulares en distintos períodos de la división celular, expresión de segundos mensajeros, activación de quinasas, etc. (Liu y cols, 2008). El resultado de su acción perturbaría la homeostasis hormonal.

Se ha evidenciado en algunos estudios que el  $Cd^{2+}$  induce una disminución del PN en animales de laboratorio, donde el suministro de este metal durante la preñez produce bajo peso de PN de las crías y una alta acumulación de  $Cd^{2+}$  en la placenta no así en los fetos, lo que sugiere que el mecanismo por el cual produce un bajo PN en el feto es mediado por efectos a nivel placentario (Ahokas, 1979).

### **Bajo peso de nacimiento y reprogramación fetal.**

La disminución del PN de las crías es una consecuencia multifactorial, que depende de factores genéticos y ambientales. Dentro de estos últimos, se encuentran aquéllos que afectan el ambiente intrauterino, siendo los más estudiados los factores nutricionales y hormonales. Una alteración del ambiente intrauterino induce en el feto una adaptación fisiológica para sobrellevar este efecto adverso, que le permite crecer y desarrollarse hasta alcanzar el nacimiento, pero que al largo plazo, podría tener consecuencias adversas para el mismo. A esta adaptación por parte del feto se le ha llamado reprogramación fetal (RF) (Godfrey y Barker, 2001) y más recientemente plasticidad metabólica o del desarrollo, siendo la disminución del PN la respuesta adaptativa inmediata que permite que el feto sobreviva hasta el nacimiento (Gicqel, 2008).

Datos epidemiológicos sugieren que cambios a nivel intrauterino tendrían efectos a largo plazo, aumentando el riesgo de las crías a presentar enfermedades en la vida adulta como: hipertensión, enfermedad coronaria, dislipidemias, Diabetes Mellitus no insulino dependiente, etc. Factores como la nutrición pre y post natal, afectan el PN, disminuyéndolo en situaciones de desnutrición materna. Un bajo PN se correlaciona fuertemente con la aparición de alguna de las patologías mencionadas en la vida adulta (Moreno y Dalmau, 2001).

El hábito de fumar durante la gestación se ha asociado en numerosos estudios a bajos PN, aborto espontáneo, mortalidad prenatal y neonatal, y defectos en el desarrollo de los hijos de estas madres. Comparando madres no-fumadoras con madres fumadoras, se ve que las segundas tienen una mayor concentración de  $Cd^{2+}$  en plasma y placenta, y a su vez presentan hijos con menores PN (Ronco y cols, 2005). Estos resultados sugieren que una exposición prenatal a  $Cd^{2+}$  puede ser un factor que altere el medio intrauterino llevando a RF; sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido considerada, ni mucho menos estudiados los mecanismos involucrados en ella.

### **Factores hormonales que afectan el PN: Glucocorticoides.**

Dentro de los factores hormonales que afectan el PN se encuentran los glucocorticoides (GC). Los GC son hormonas de la familia de las hormonas esteroidales, producidas principalmente en la corteza adrenal, y tienen efecto sobre la función celular en todos los órganos y sistemas, particularmente en términos de diferenciación y homeostasis (Ganong, 2000). Esta acción es especialmente importante durante la preñez, donde ayudan a la correcta adaptación de la madre en esta etapa, a la maduración de los órganos y sistemas fetales, se sabe que también influyen en el trabajo de parto (Michael y Papageorghiou, 2008).

Los GC tienen un importante efecto en el crecimiento y desarrollo del feto, así, una sobreexposición a GC llevará a una serie de consecuencias negativas para el feto, entre ellas una disminución del PN, un aumento del riesgo de parto prematuro, efectos sobre el desarrollo del cerebro y posiblemente a trastornos en la vida adulta del mismo, como diabetes mellitas tipo II, hipertensión, entre otras. (Burton y Waddell, 1999; Michael y Papageorghiou, 2008).

## **Mecanismo de acción de los Glucocorticoides.**

Los GC actúan en la mayoría de las células del organismo, teniendo distintos efectos, según el órgano blanco. Su mecanismo de acción es mediada por la unión de los GC a receptores intracelulares (GR) que se encuentran normalmente en el citoplasma; la unión GC-GR produce un complejo activo que viaja al núcleo de la célula para ejercer su acción, activando o inhibiendo la transcripción de ciertos genes, dependiendo de su tejido blanco (Michael y Papageorghiou, 2008).

Otro mecanismo de regulación intracelular de los GC en los distintos órganos es a través de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroidehidrogenasa (11 $\beta$ -HSD), que tiene dos isoformas, la 11 $\beta$ -HSD1 y la 11 $\beta$ -HSD2, la primera es la encargada de activar los corticoides: transforma cortisona en cortisol en humanos, y a la 11-dehidrocorticosterona en corticosterona en rata. La 11 $\beta$ -HSD2 cataliza el proceso inverso, o sea inactiva a los corticoides (Schoof y cols, 2001). La isoforma 1 (11 $\beta$ -HSD1) es dependiente del cofactor enzimático NADP<sup>+</sup>, esta isoforma se encuentra de manera abundante en la mayoría de los tejidos blancos de GC, como por ejemplo: hígado, útero, cerebro y ovario. A diferencia de la anterior, la isoforma 2 (11 $\beta$ -HSD2) es NAD<sup>+</sup> dependiente, y se expresa mayoritariamente en tejidos blancos de mineralocorticoides, tracto reproductivo femenino, cuerpo lúteo y la placenta. (Burton y Wadell, 1999).

## **Importancia de la placenta en la regulación de los GC.**

La placenta es un tejido feto-placentario que tiene como función la implantación y mantención del feto, proveyéndole soporte, nutrientes y transporte de gases (Ganong, 2000). La placenta es un tejido blanco para la acción de los GC, expresándose en ella de manera abundante la enzima 11 $\beta$ -HSD2 tanto en humanos como roedores (Escher y cols, 1998). Esta enzima juega un rol clave en la regulación de la concentración de GC a nivel placentario-fetal, siendo muy activa a nivel placentario; se ha visto que cerca de un 85% del cortisol inyectado a la madre pasa como cortisona a la circulación umbilical, impidiendo así una sobre exposición de GC activos en el feto (Burton y Wadell, 1999). Estudios *in-vitro* con trofoblastos humanos demuestran que un aumento de GC produce un aumento en la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, lo que sugiere un rol protector de la placenta frente a niveles aumentados de GC (Beek y cols, 2004). Los datos de la literatura nos sugieren entonces un rol protector de la placenta sobre el feto, ya sea regulando

los niveles de exposición a ciertas hormonas como GC, o evitando (o disminuyendo) el paso de elementos tóxicos como  $\text{Cd}^{2+}$  desde la circulación materna a la fetal (Piasek y cols, 2001).

### **Hipótesis**

La exposición a cadmio durante la gestación induce un menor peso de nacimiento asociado a una alteración de los glucocorticoides maternos y fetales.

### **Objetivo general**

Demostrar que la exposición a cadmio durante la gestación en ratas induce un menor peso de nacimiento mediado por una alteración metabólica-endocrina

### **Objetivos específicos**

- 1.- Evaluar, en un modelo experimental de rata preñada, la menor dosis de exposición a cadmio que induzca bajo peso de nacimiento de las crías.
- 2.- Demostrar que el cadmio se acumula en la placenta y no atraviesa la barrera placentaria.
3. Estudiar si existe una asociación entre menor peso de nacimiento de las crías y aumento de la concentración de cadmio en placenta.
- 4.- Determinar las concentraciones de glucocorticoides en placentas y plasma materno y fetal.
- 5.- Demostrar que existe una asociación entre la concentración de cadmio en placentas, peso de nacimiento de las crías y niveles de corticosterona placentarios.
6. Demostrar que el efecto de cadmio sobre la corticosterona está relacionado con la actividad enzimática de la  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2.
7. Demostrar que la exposición a cadmio en ratas preñadas afecta el potencial reproductivo de las crías hembras (F1).

## **Materiales y Métodos.**

### **Modelo de estudio.**

Se utilizó ratas de la cepa Wistar como modelo de estudio. Los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del INTA cuyo certificado se adjuntó al proyecto al momento de ser presentado al Concurso Regular de Fondecyt el año 2007.

Las ratas se mantuvieron en el vivero del INTA con alimento marca Champion para roedores de las siguientes características:

### **Ingredientes generales:**

Maíz, harina de trigo, harina de soya, afrechillo de trigo, harina de pescado, harina de carne, harina de alfalfa.

### **Minerales:**

Fosfato bicálcico, carbonato de calcio, sal común, sales de selenio, manganeso, cobalto, cobre, zinc, yodo, hierro, magnesio y potasio.

### **Vitaminas:**

vitamina A, C, D, E, K, B1, B2, B6, B12, Acido Pantoténico, Niacina, Biotina, Colina, Acido Fólico.

Análisis químico proximal del alimento (Centro de Alimentos, INTA):

Análisis	g/100g
Humedad (g)	4,92
Proteínas (g)	12,69
Grasa Total (g)	33,41
Cenizas (g)	4,22
Fibra Cruda (g)	2,18
ENN (g)	42,58
Energía (Kcal)/100 g	522

Condiciones Generales de los Tratamientos:

La alimentación fue “*ad libitum*” durante todo el período experimental. El régimen de los animales fue de 12 h de luz y 12 h de oscuridad para todos los grupos de estudio.

Los animales permanecieron en jaulas individuales; a aquellos seleccionados para tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  se les suministró como  $\text{CdCl}_2$  disuelto en el agua de bebida (es completamente soluble en agua) en distintas concentraciones como única fuente de agua. Los animales controles recibieron agua destilada.

Criterios de inclusión de los animales:

- Ratas hembra de aproximadamente 60 días de vida (maduras sexualmente) en período de estro, que corresponde al momento en que la hembra acepta al macho para la cópula; este período se puede evidenciar por medio de la visualización de células globosas y descamativas en el frotis vaginal.

- Vírgenes al momento de iniciar los cruzamientos.
- Peso corporal 200 y 250 g al momento de iniciar los cruzamientos.

Las ratas se colocaron en jaulas en una relación de 2:3 (machos: hembras) durante todo el día y toda la noche para el acostumbramiento de los animales y posterior cruzamiento.

La detección del cruzamiento se realizó durante las mañanas, (9 AM) por citoscopía vaginal, mediante el lavado y aspirado vaginal con suero fisiológico; el aspirado se observaba al microscopio óptico. La visualización al microscopio de los espermatozoides se tomó como cruzamiento positivo.

Una vez detectado el cruzamiento, la rata preñada era puesta en jaula individual para iniciar el tratamiento con  $Cd^{2+}$ . El tratamiento duró todo el período de preñez durante el cual se realizaron las siguientes determinaciones:

- consumo de agua de forma diaria por medio de bebederos graduados.
- consumo de alimento semanal por animal.
- peso de la madre por semana.

El estudio se dividió en 2 fases:

### Fase 1

Objetivo: Encontrar una dosis de  $Cd^{2+}$  administrada durante la preñez que induzca menor PN en comparación con los animales control sin alterar el desarrollo aparente de las crías. Antecedentes de la literatura describen un porcentaje de absorción a nivel intestinal de un 5%, aumentando hasta el doble durante la gestación (Herba y cols, 2000).

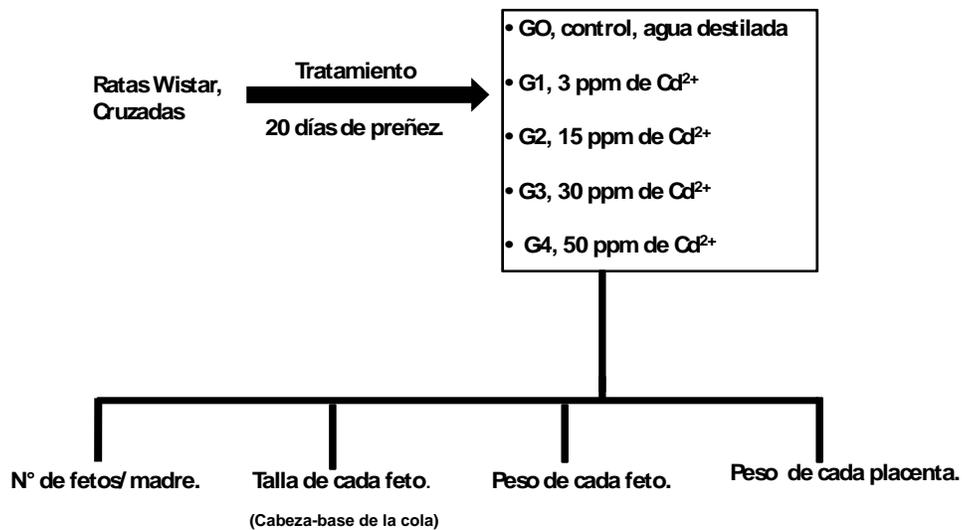
Los animales se distribuyeron en 5 grupos: uno control y cuatro con tratamientos de distintas dosis de  $Cd^{2+}$  descritas en la tabla. El tratamiento se impuso desde el día “cero” de gestación, correspondiente al día en que se detectó la cruce. Las concentraciones de  $Cd^{2+}$  usadas en la fase 1 son dosis que se encuentran entre 1 y 50 ppm, que corresponden a los niveles de exposición bajo y ocupacional, respectivamente en humanos (Brzosca y cols, 2005).

Al día 20 de gestación, se realizó una cesárea y se realizaron las mediciones corporales. Las ratas fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub>, y se procedió con la cirugía. Todas las cesáreas se realizaron en la mañana (9:00-11:00 h).

**Tabla 1: Grupos de tratamiento**

Grupo	Concentración de Cd <sup>2+</sup> (ppm)	Nº de animales (n)
0	0	7
1	3	6
2	15	6
3	30	9
4	50	6

En el siguiente cuadro se puede ver el esquema del estudio de la Fase 1



## Fase 2

Objetivo: seleccionar el grupo de tratamiento que presente crías de PN significativamente menor que el grupo control para continuar con los objetivos específicos propuestos.

Siguiendo los mismos criterios de selección, mantención y evaluaciones ya descritas; al día 20 de gestación se realizó una cesárea para la obtención de las muestras. Las ratas eran anestesiadas con CO<sub>2</sub>, y se procedía con la cirugía. Todas las cesáreas se realizaron en la mañana (9:00-11:00 h).

### **Extracción y almacenamiento de muestras.**

Se registraron los datos corporales y se extrajeron las placentas y los fetos y se tomaron muestras de sangre de madres y fetos. Las placentas fueron almacenadas en nitrógeno líquido y luego a -80°C. Las muestras de sangre se centrifugaron a 976 G durante 15 minutos para separar el plasma, el que se almacenó a -80° C.

Los fetos completos se almacenaron a -20°C. Posteriormente, se liofilizaron para la determinación de Cd<sup>2+</sup>.

### **Determinación de la concentración de Cd<sup>2+</sup>**

La concentración de Cd<sup>2+</sup> se determinó en las placentas de las madres de los distintos grupos.

### **Tratamiento de las muestras**

Para las placentas y fetos: los tejidos congelados fueron liofilizados. Para ello se utilizó un liofilizador (SAVANT, Inglaterra) dejándolos toda la noche hasta obtención de una humedad menor que 1%. Las muestras liofilizadas fueron disueltas en una solución de HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se les agregó un estándar interno de indio y se llevaron a un volumen final de 5-10 ml.

El Cd<sup>2+</sup> se determinó a través del método de plasma acoplado inductivamente a un espectrómetro de masas (ICP-MS), que es una metodología que permite análisis de compuestos

químicos con alta sensibilidad y especificidad, permite determinar elementos del orden de los ng/ml, lo que lo hace ideal para la determinación de elementos traza (Stumpf y Labarraque, 2005). En el caso del Cd<sup>2+</sup> utiliza para la determinación la masa de Cd<sup>111</sup> como marcador, y su límite de detección es 15 o 30 ng/ml de acuerdo a la matriz analizada.

Estas determinaciones se realizaron en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN), laboratorio de referencia internacional para estas determinaciones.

### **Determinación de las concentraciones de corticosterona en plasma de madres, fetos y placentas.**

#### **Muestras de sangre**

Las muestras de sangre se extrajeron el día 20 de gestación, siempre a la misma hora (9:00-11:00 h) para evitar las variaciones circadianas. La sangre fue recibida en tubos heparinizados.

Para los fetos, debido al pequeño volumen de sangre, se hizo un “pool” de muestras de sangre de todos los fetos de cada madre.

Los plasmas, extraídos de acuerdo a lo descrito previamente, se mantuvieron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis por medio de un kit comercial de análisis inmuno-enzimático (EIA) del laboratorio Cayman Chemical. Los resultados se expresan en ng/ml

#### **Muestras de placenta**

Las placentas almacenadas a -80°C se homogenizaron de la siguiente manera: 125 mg (aprox.) de placenta con 300 µl del EIA buffer (que contiene: 0,1% BSA, 0,4 M NaCl, 0,1 mM EDTA y 0,01% ácido sódico) y se centrifugaron a 13.750 G durante 15 minutos. El sobrenadante se usó en una dilución 1:10.

Para poder expresar los resultados como ng de corticosterona por mg de proteína, del sobrenadante se midieron las proteínas totales por medio de un kit Bio Rad. Este se basa en la

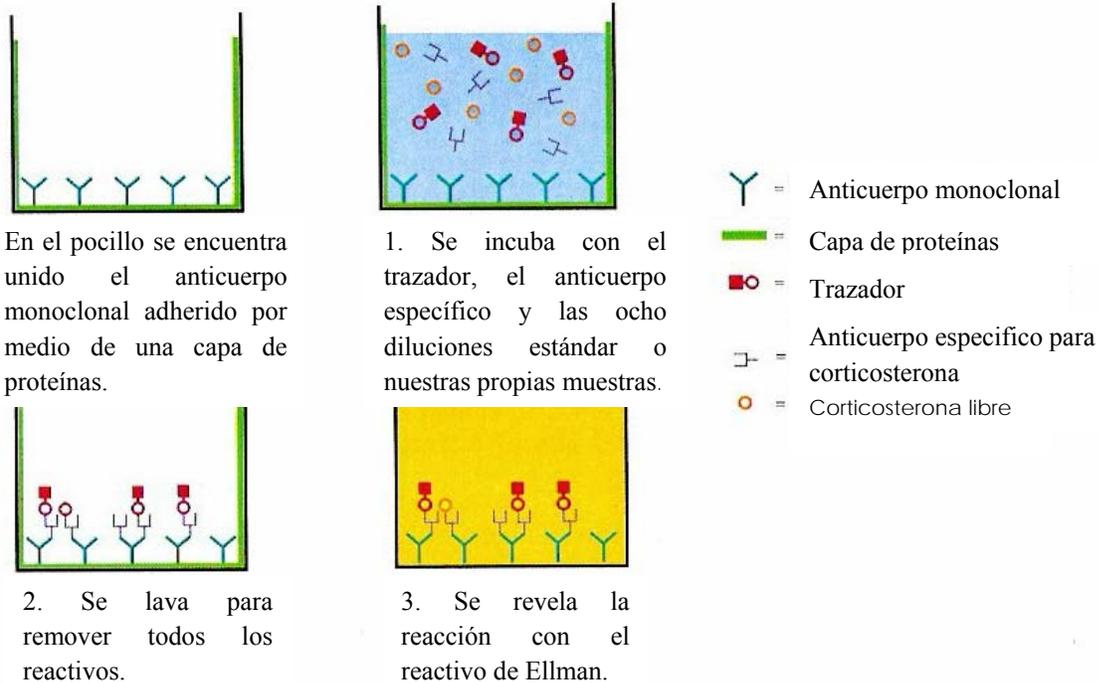
determinación de proteínas por espectrofotometría; la absorbancia se midió a 630 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (ELX 800, Biotek Intrumentals, INC).

### **Detección de corticosterona por EIA**

Este ensayo se basa en la competencia por un número limitado de anticuerpos (AC) específicos para corticosterona, entre la corticosterona de la muestra y un trazador de corticosterona (compuesto por corticosterona-acetilcolinesterasa: AChE). La magnitud del complejo corticosterona-AC o trazador-AC dependerá de la concentración de corticosterona de la muestra ya que a mayor cantidad de corticosterona en la muestra, mayor será el desplazamiento del trazador de los sitios de unión del AC, este desplazamiento se visualizará con el reactivo de Ellman, que contiene el sustrato para la acción de la enzima acetilcolinesterasa. La reacción de esta enzima con el reactivo produce variaciones en la intensidad del color, dependiendo de la cantidad presente. Siendo la enzima desplazada por la corticosterona de la muestra, dará entonces distintas absorbancias dependientes de las concentraciones de la hormona (Kit Cayman Chem).

En ambos casos, tanto en plasma como en placentas, se mide la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro (ELX800) a 405 nm de longitud de onda.

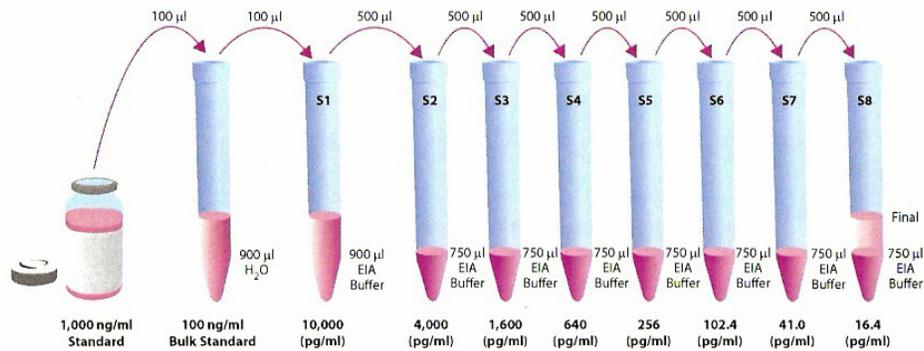
## Fundamento del método de EIA



**Tabla 2: Especificidad del Kit**

Corticosterona	100%
11-deoxy Corticosterona	19.6%
Progesterona	1.01%
Aldosterona	0.25%
Androstenediona	0.24%
Cortisol	0.18%
Testosterona	0.18%
5 $\alpha$ -DHT	0.03%
Cortisona	0.02%
DHEA	<0.01%
DHEA-S	<0.01%
Pregnenolona	<0.01%

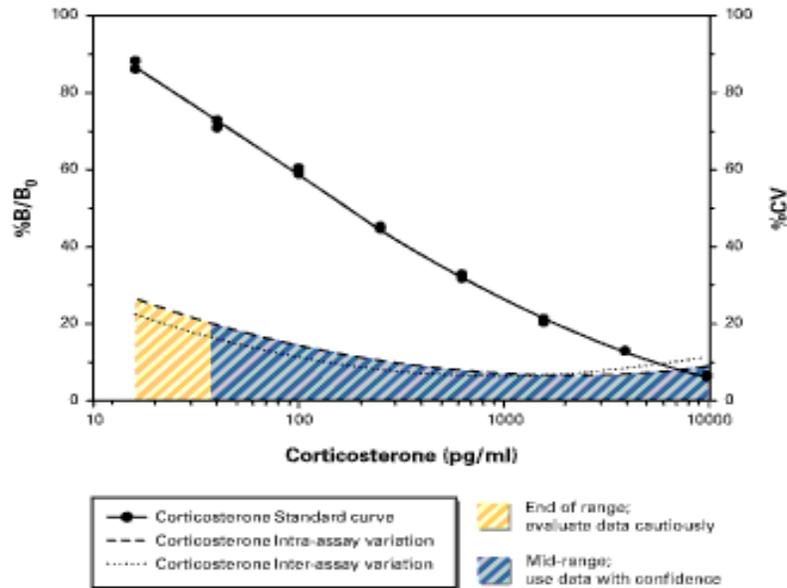
Para los cálculos de las concentraciones de corticosterona, es necesario la presencia en el ensayo de blancos (sin muestra, Blk), B<sub>0</sub> (máxima unión con el anticuerpo), NSB (unión inespecífica al anticuerpo o la placa) y la curva estándar. La curva estándar de calibración se obtiene de 8 diluciones desde un estándar de concentración conocida de corticosterona (1000 ng/ml).



Las absorbancias obtenidas se someten a la siguiente fórmula:

$$B_0 - \text{Blk} = B_0 \text{ corregido} \Rightarrow \frac{(\text{Abs} - \text{Blk})}{B_0 \text{ Corregido}} * 100 \Rightarrow \%B/B_0$$

El %B/B<sub>0</sub> se extrapola a la curva de calibración y de este modo se obtiene la concentración en pg/ml de corticosterona, los cuales se pasan a ng/ml para facilitar su expresión en los resultados.



**Actividad enzimática de 11 β-HSD2.**

La actividad enzimática se determinó por un ensayo radiométrico. Este método consiste en la medición del producto de la reacción catalizada por la enzima, la 11-dehidrocorticosterona. Para ello se utilizó el sustrato marcado con tritio, la <sup>3</sup>H-corticosterona que, de acuerdo a la actividad de la enzima presente en las muestras analizadas, se convertirá en <sup>3</sup>H-11-dehidrocorticosterona. (Yang y cols, 2005).



La actividad de la enzima se determinó en muestras de placenta recién extraídas. Estudios preliminares demostraron que el congelamiento de las muestras produce un deterioro de la actividad enzimática.

Después de realizar numerosos estudios para determinar la concentración de proteínas totales por muestra y el tiempo de incubación óptimos requeridos para el ensayo enzimático, se llegó a la conclusión que una concentración de 200µg/ml por un período de incubación de 1 h en baño a 37°C eran las condiciones de actividad máxima de la enzima.

### **Procedimientos.**

Durante la cesárea se extrajeron dos placentas de cada rata, se homogenizaron con el buffer de homogenización en una relación de 100 mg de placenta por 1 ml de buffer.

Buffer de Homogenización: 250 mM de Sacarosa.

10 mM Tris.

2 mM EDTA.

Llevado a pH 7.5 con HCl.

El tejido placentario homogenizado se filtró por gasa y se dividió en 2 alícuotas: una para determinación de proteínas y la otra para determinación de la actividad enzimática.

Determinación de proteínas: Se usó el kit Bio Rad ya descrito anteriormente para proteínas, dilución 1:5 del homogenizado (20 µl del homogenizado más 80 µl de buffer de homogenización). Una vez obtenida la cantidad de proteínas del homogenizado se ocupan 200 µg de proteínas para el protocolo de actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática:

Se sigue un protocolo de incubación (tabla 3) por 1 hora a 37° C en un baño con agitación.

Dado que existe un pequeño porcentaje de conversión de corticosterona a 11-dehidrocorticosterona que ocurre independiente de la enzima, se utiliza un blanco que carece de tejido y por ende de la enzima, como control de esa conversión. Cada muestra junto con los blancos se analizaron en cuadruplicado.

**Tabla 3: Protocolo de incubación (µl)**

Condición	Tejido (Homogenizado)	Buffer	NAD	H <sup>3</sup> corticosterona	Corticosterona
<b>Bco</b>	***	422	63	10	5
<b>Bco</b>	***	422	63	10	5
<b>Bco</b>	***	422	63	10	5
<b>Bco</b>	***	422	63	10	5
<b>Muestra</b>	20	402	63	10	5
<b>Muestra</b>	20	402	63	10	5
<b>Muestra</b>	20	402	63	10	5
<b>Muestra</b>	20	402	63	10	5

El volumen final de incubación es de 500 µl. El valor “20” de la muestra es a modo de ejemplo.

Corticosterona radiactiva: <sup>3</sup>H-corticosterona (Amersham, 1,2,6,7 <sup>3</sup>H-corticosterona; a.e. 79Ci/mol; 1 mCi/ml; 1 µCi/µl . Volumen total: 250 µl).

El día del experimento se tomó 1 µl (1 µCi) se evaporó a sequedad con N<sub>2</sub> gaseoso (para eliminar solvente orgánico y evitar su oxidación). Se agregaron 100 µl de medio o buffer y finalmente se agregaron 10 µl por tubo: 0,1 µCi= 2,53 nM. Se midió el número total de cuentas radioactivas por minuto agregadas (cpm) en los 10 µl en un contador de centelleo líquido para radiación β (Packard 1600TR, Canberra Company).

Corticosterona fría (SIGMA): La corticosterona fría se usa como sustrato para la reacción enzimática, la concentración usada para la incubación fue de 1 nM. Se preparó una solución stock (A) de corticosterona en etanol, a 10 nM, la que fue diluida seriadamente hasta obtener una solución (B) con una concentración de 1  $\mu$ M.

NAD (SIGMA): Este cofactor enzimático es necesario para la actividad de ciertas enzimas, como la 11 $\beta$ -HSD2. El ensayo se realizó a una concentración final de NAD de 400  $\mu$ M.

Una vez terminado el período de incubación se procedió a la extracción de esteroides y posterior separación por cromatografía en capa fina (TLC).

#### Extracción de los esteroides

Terminada la hora de incubación, la reacción se detuvo en hielo, se agregó 1 ml de etiloacetato para extraer los esteroides. Para mezclar los componentes se agitó durante 3 minutos y para la separación de las fases se centrifugó los tubos a 1,465 G durante 15 minutos.

Se tomó 500  $\mu$ l de la fase orgánica (sobrenadante), sin mezclar con la fase acuosa.

La fase orgánica se llevó a sequedad por corriente de N<sub>2</sub>.

#### Cromatografía en capa fina (TLC)

Esta técnica fue usada para la visualización de los esteroides (corticosterona y 11-dehidrocorticosterona) necesarios para calcular la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2. La TLC permite separar dos compuestos de acuerdo al grado de partición que presenta cada uno de ellos en una fase móvil y una fase estacionaria; la fase móvil corresponde a una solución orgánica, en este caso cloroformo-metanol (9:1 v/v) y la fase estacionaria a la sílica presente en una placa con soporte de aluminio (20X20 cm, Merck).

Debido a que los esteroides radiactivos están en pequeñas concentraciones difícil de visualizar, es necesario utilizar los mismos esteroides, pero no radioactivos, para “arrastrar” y

poder visualizar los esteroides radioactivos y luego cuantificarlos. Estas soluciones se agregan a la muestra previa siembra de ellas en la placa cromatográfica.

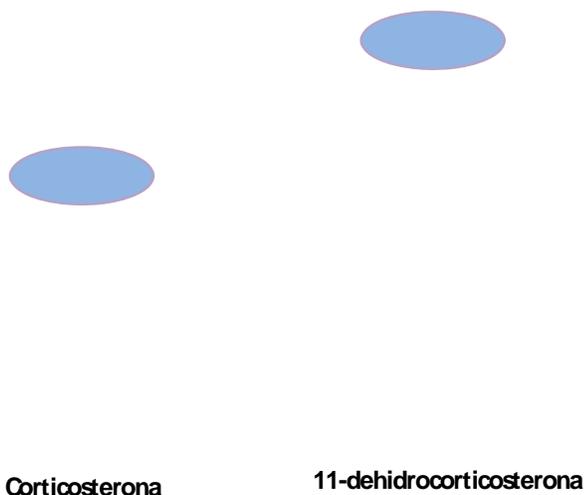
A continuación los esteroides utilizados:

Corticosterona (SIGMA): 2 mg de corticosterona +1 ml de metanol.

11-dehidrocorticosterona (STERALOIDS): 2 mg de 11-dehidrocorticosterona + 1 ml de metanol.

Al residuo ya seco de la fase orgánica se agregó la solución de esteroides fríos que actuaron como “carrier” para ayudar en la separación de los analitos: 10 µl de corticosterona fría + 10 µl de 11-dehidrocorticosterona.

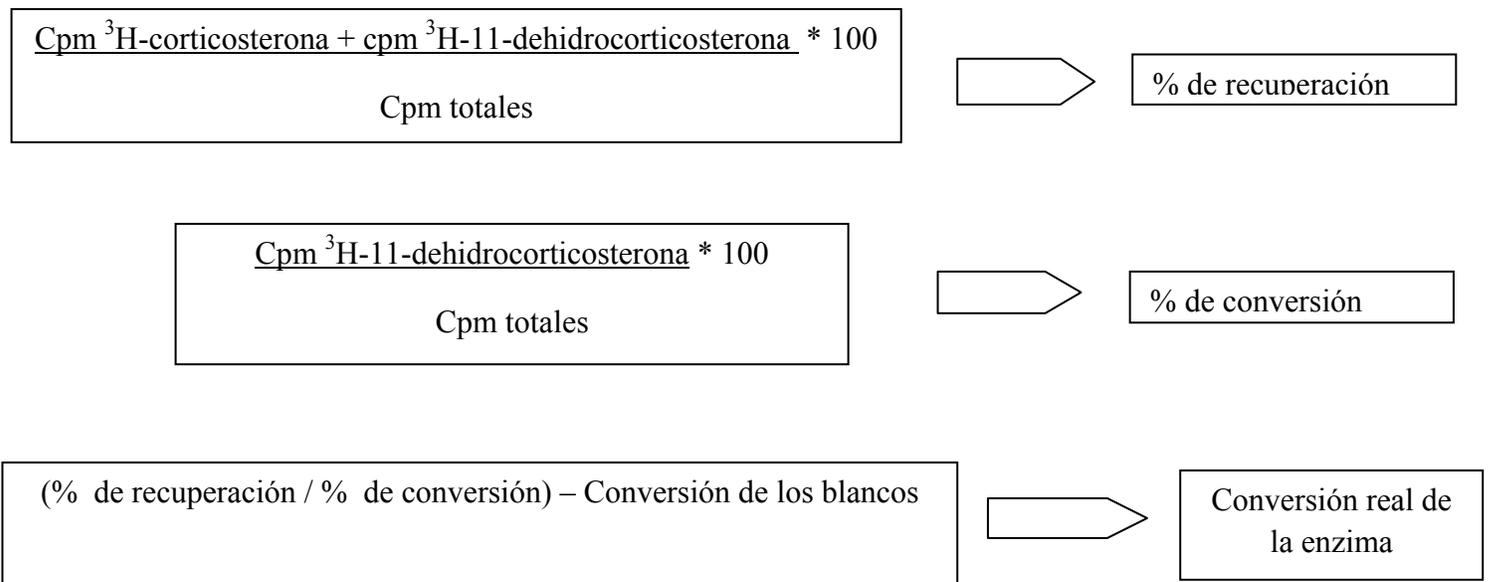
Se sembró en las placas de cromatografía las muestras y estándares. Luego de 2 h aproximadas, los esteroides en la placa se visualizaron a través de una lámpara con luz UV como una mancha azul cuya posición es consecuencia de la estructura de cada molécula.



Las marcas correspondientes a ambos esteroides se recortaron y pusieron en viales de centelleo, se les agregó 50 µl de agua destilada para la activación de las placas. Se les añadió 6 ml de líquido de centelleo, y se mezclaron en vortex durante 1 minuto.

La radioactividad se contó por espectrometría de centelleo líquida para radiación β (Packard 1600TR, Canberra Company).

El cálculo de los resultados se hizo en base a las cuentas por millón totales (cpm totales) de acuerdo a la fórmula descrita:



### **Potencial reproductivo de F1.**

Para estudiar si el tratamiento prenatal con  $\text{Cd}^{2+}$  afecta la capacidad reproductiva de las crías hembra, se realizó un estudio de fertilidad en la edad adulta.

Ratas hembras que cumplían con los siguientes requisitos:

- Vírgenes.
- 60 días de edad aproximada.
- Entre 200 y 250 g de peso.

Las ratas fueron cruzadas con machos de fertilidad conocida, una vez detectada la cruce comenzaba el tratamiento.

Grupo control: Sin tratamiento, recibieron agua destilada y alimentación *ad libitum* (dieta Champion para ratas), el n de este grupo fue de 4 ratas.

Grupo tratado (G3\*): Con tratamiento de 30 ppm de  $Cd^{2+}$  en el agua de bebida como  $CdCl_2$  durante la preñez, alimentación *ad libitum* igual que el grupo control, el n de este grupo fue también de 4 ratas.

Al término de gestación, para ambos grupos se seleccionaron aleatoriamente 6 crías hembras por madre, las que se mantuvieron durante el período de lactancia con dieta y agua normal junto a sus madres. El día 21 de nacidas se realizó el destete, consistente en la separación de las crías y su madre. Las F1 se criaron hasta los 58 días de vida, durante los cuales la alimentación y agua fue *ad libitum* y sin ningún tipo de tratamiento para ambos grupos. Cumplidos los 58 días se inició el estudio de fertilidad.

Para el estudio de fertilidad se eligieron de las 6 crías, sólo dos por madre, dando como resultado un total de 8 hembras por grupo de F1.



La medición de la fertilidad de las hembras se hizo estudiando los siguientes parámetros reproductivos:

- Días de espera: Corresponden a los días en que tarda la hembra en presentar una mayor proporción de células globosas y descamativas en desmedro de otros tipos celulares en su

aspirado vaginal desde el día 58, la presencia de estos tipos celulares corresponde al proestro-estro e inicio de un ciclo. Diariamente entonces se revisaba la condición de la citología vaginal, ésto se realizaba a la misma hora (9 AM) y se anotaban los días que tardaba cada rata para iniciar el ciclo, vale decir, presentar las células globosas y descamativas.

- Días abiertos: Se definen como los días necesarios para conseguir una crua (visualización de los espermatozoides), entre ciclo.
- Tamaño de camada: Entendiéndose como el número de crías de cada madre y sus pesos promedios. Una vez cruzada la rata, se mantenía hasta el parto, con alimentación y bebida *ad-libitum*. Una vez ocurrido el parto, se contaban y pesaban todas las crías de cada rata, esto dentro de las 24 h posteriores al nacimiento.
- Tasa de fertilidad: Corresponde al número de hembras que se cruzó efectivamente durante el periodo de cruzamientos (1 mes).

Por último, al término de preñez de las F1 que se cruzaron efectivamente, se evaluó el peso y número de crías de las madres.

### **Análisis estadístico**

Para definir la normalidad de los datos se utilizo el test de normalidad Shapiro-Wilk en todas las variables.

En las variables que presentaron distribución normal (paramétricas) se realizó una prueba de ANDEVA para ver efecto de tratamiento y para diferencia entre medias la prueba de t de Student.

En las variables no paramétricas se utilizaron los test de Mann-Whitney para ver diferencias entre dos grupos independientes, y Kruskal-Wallis para más de dos grupos.

Para ver asociaciones entre variables fue el coeficiente de Pearson y Spearman, según fuese paramétrico o no paramétrico, respectivamente.

## Resultados

### Características de las madres.

Entre las características de las madres, se evaluó el peso de cada una de ellas en el momento de la cruce y el peso al momento de la cesárea; también se evaluó el consumo de alimento de las mismas; solo las variables consumo de alimento y peso de las madres presentaron una distribución normal, y se realizó la prueba de ANDEVA en estos casos para ver efecto de tratamiento. No se encontraron efecto del tratamiento entre los grupos para estas variables. Para el resto de las variables se realizó la prueba de Kruskal Wallis. El consumo de agua fue menor en los grupos tratados a partir de 15 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  (G2) y se mantuvo menor en los grupos de mayor concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  (G3 y G4) (Tabla 1).

Se realizó un análisis teórico del consumo de  $\text{Cd}^{2+}$  tomando el agua de bebida como única fuente de exposición a cadmio. Se observa que el grupo 4 consumió una concentración de 1,24 mg diarios durante 20 días lo que da un consumo total de 24,8 mg de  $\text{Cd}^{2+}$  (Tabla 4).

**Tabla 4: Antecedentes de las madres**

	G0 (0 ppm Cd <sup>2+</sup> )	G1 (3 ppm Cd <sup>2+</sup> )	G2 (15 ppm Cd <sup>2+</sup> )	G3 (30 ppm Cd <sup>2+</sup> )	G4 (50 ppm Cd <sup>2+</sup> )
N	7	6	6	9	6
*Peso madre al cruce (g)	223,7 ± 5	216,2 ± 6,0	220,0 ± 6,0	230,5 ± 5,0	228,8 ± 5,0
*Peso madre al término (g)	390,6 ± 8,0	374,8 ± 14,0	360,3 ± 11,0	360,1 ± 6,0	356,7 ± 9,0
Consumo de agua/día (ml)	40,3 ± 7,0 <sup>a</sup>	43,1 ± 10,0 <sup>a</sup>	28,9 ± 6,0 <sup>b</sup>	27,5 ± 6,0 <sup>b</sup>	24,8 ± 5,0 <sup>b</sup>
Consumo de Cd <sup>2+</sup> /día (mg.)	0,0	0,13 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Consumo total de Cd <sup>2+</sup> durante la preñez (mg)	0,0	2,65 ± 0,6	8,86 ± 2,0	16,9 ± 4,0	24,8 ± 5,0
Consumo de alimento (g/ semana)	149,2 ± 4,0	143,9 ± 7,0	132 ± 1,0	139,0 ± 4,0	139,0 ± 4,0

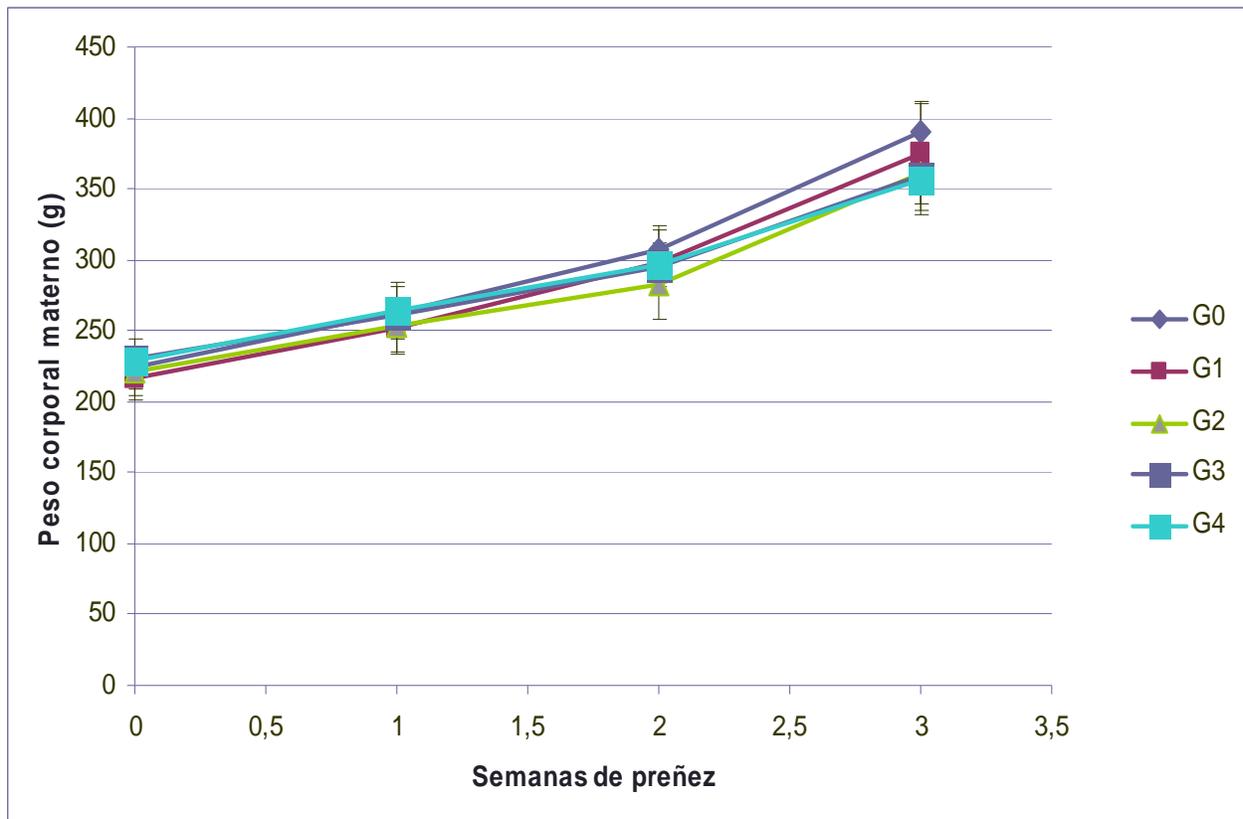
Resultados expresados como promedio ± desviación estándar (DE).

\*promedio ± el error estándar (EE).

a ≠ b, p = 0,000001, Kruskal-Wallis.

Una vez detectada la preñez, se pesaron las ratas 1 vez por semana hasta el día de la cesárea. Los resultados están graficados en gramos de peso corporal materno para las distintas semanas de gestación. No se observa diferencias en la variación de peso semanal entre las madres de los distintos grupos de tratamiento (Fig. 1).

**Figura 1: Variación de peso de las madres durante el periodo de preñez.**



### **Determinación de las concentraciones de Cd<sup>2+</sup>**

La concentración de Cd<sup>2+</sup> en placentas al término de la gestación de los 4 grupos tratados está descrita en la Tabla 5. Se observa una acumulación de Cd<sup>2+</sup> que es dependiente de la dosis de Cd<sup>2+</sup> administrada en cada tratamiento.

En los fetos liofilizados no se encontraron niveles detectables de Cd<sup>2+</sup>.

**Tabla 5: Concentración de Cd<sup>2+</sup> en placentas**

G0 (n=6)	G1 (n=4)	G2 (n=4)	G3 (n=6)	G4 (n=9)
ND	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,5 <sup>c</sup>

Resultados se expresan como promedio ± DE (µg/g peso seco). ND: no detectado

a≠b≠c, Kruskal-Wallis

a≠b, p = 0,02; a≠c, p = 0,005; b≠c, p = 0,003, Mann-Whitney.

### **Características de los fetos.**

Se revisaron las siguientes variables corporales de los fetos: talla y peso corporal, además del peso de las placentas. La única diferencia encontrada fue en el PN de los fetos del grupo 4, que mostró un PN significativamente menor que los fetos de las madres del grupo control. El G1 presentó un PN mayor al G0, pero no es una diferencia significativa. No hubo diferencias significativas ni en la talla de los fetos ni en el n° de crías, ni en el peso de las placentas (Tabla 6).

**Tabla 6: Antecedentes de las crías**

	N° de crías	Peso (g)	Talla (cm)	Peso placentas (g)
G0 (n=83)	15,0± 2,0	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
G1 (n=64)	14,7 ± 3,5	3,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
G2 (n=61)	14,0 ± 1,8	3,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2	0,54 ± 0,1
G3 (n=109)	14,3 ± 2	3,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>	3,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1
G4 (n=91)	15,2 ± 2	3,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1

Los resultados se expresan como promedio ± DE.

a≠b, p = 0,000001, Kruskal-Wallis.

Para evaluar si las crías del grupo 4 tenían restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), se utilizó el concepto y definición propuesta por Neitzke y cols (2008) específicamente referido al modelo de la rata. Neitzke define RCIU en ratas como el promedio del PN de las ratas control menos 2 DS.

De acuerdo a la fórmula:

$$\text{PN} - 2 \text{ DS} = \text{RCIU}$$

$$3,57 - 2 * 0,33 = 2,91$$

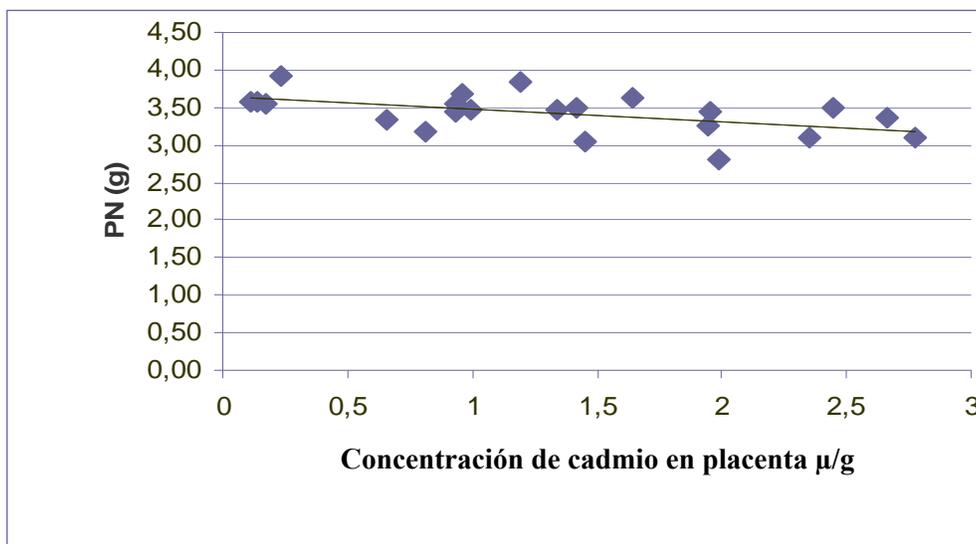
En el grupo G4, 12 fetos registraron un PN inferior a 2,91g. En este grupo, un 13,2% de los fetos tuvo RCIU.

Analizando el PN promedio de cada grupo, se encontró que ningún grupo presentó RCIU, aunque se registraron casos individuales de RCIU, los que específicamente correspondieron al

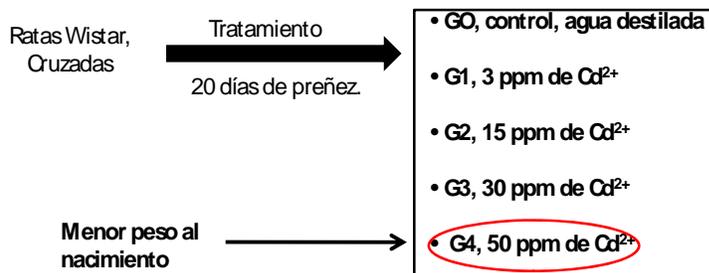
13,2% de las crías analizadas en el G4 (50 ppm  $\text{Cd}^{2+}$ ). Los otros grupos presentaron casos aislados de RCIU que no superaron al 3% de los casos.

Se evaluó si las concentraciones placentarias de  $\text{Cd}^{2+}$  se correlacionaban con el PN, encontrándose un coeficiente de -0.51 (Figura 2)

**Figura 2: Correlación Cadmio-peso de nacimiento.**



De acuerdo a los resultados del estudio de la Fase 1, el PN fue el único parámetro que se modificó con diferencia estadísticamente significativa, en consecuencia, sólo el tratamiento con 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  (G4) produce menor PN.



En la Fase 2 del estudio se continuó con animales del grupo 0 (control) y 4 (experimental).

### Concentraciones de corticosterona.

Las concentraciones de corticosterona se midieron en plasma materno, fetal y en las placentas (Tabla 7). Se puede observar que en todas las muestras analizadas las concentraciones de corticosterona son significativamente mayores en G4, sugiriendo una asociación de los GC con la disminución del PN

**Tabla 7: Concentración de corticosterona**

	Corticosterona plasma materno (ng/ml)	Corticosterona plasma fetal (ng/ml)	Corticosterona placentaria (ng/mg de proteína)
G0 (n=6)	166,7 ± 49*	128,1 ± 24**	8,6 ± 1,4
G4 (n=6)	273,6 ± 43*	180 ± 19**	12,2 ± 3,1 <sup>σ</sup>

Resultados se expresan como promedio ±DE.

\*p = 0, 01, \*\* p = 0,009, <sup>σ</sup>p = 0, 03, Mann-Whitney.

### **Actividad enzimática.**

Se extrajo las placentas por cesárea a las que inmediatamente se les determinó la actividad enzimática 11 $\beta$ -HSD2 de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los resultados están expresados como porcentaje de conversión del sustrato  $\pm$  EE. En la Tabla 8 se observa la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2 placentaria, la que es mayor en el grupo 4 (G4) en comparación con el grupo control (G0), aunque los resultados no tuvieron diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 8: Actividad enzimática 11 $\beta$ -HSD2**

	% de conversión
G0 (n=8)	60,3 $\pm$ 6,4
G4 (n=6)	74,8 $\pm$ 6,3

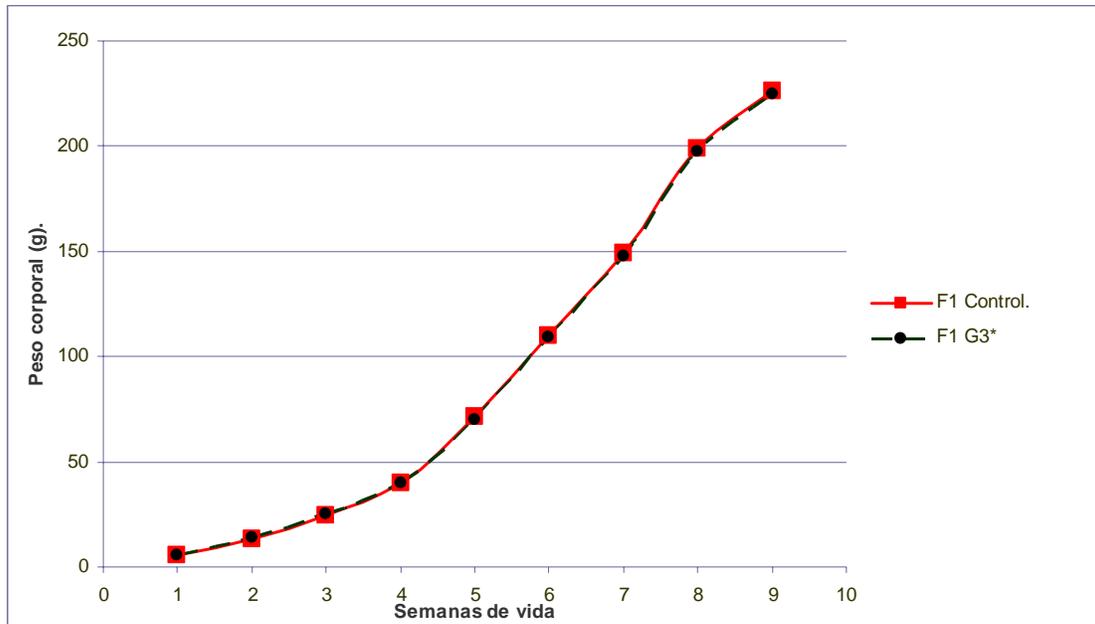
Resultados se expresan como promedio  $\pm$  EE

Se realizó una correlación entre la concentración de Cd<sup>2+</sup> en placenta, PN y concentración de corticosterona en placenta, la prueba utilizada fue la de Spearman. No se encontró una correlación significativa entre las variables.

### **Potencial reproductivo de las F1.**

Desde su nacimiento hasta su cruzamiento y posterior parto, las crías F1 hembras tanto del grupo control como del grupo tratado, fueron pesadas semanalmente, sin encontrarse diferencias entre las hijas de madres control y las hijas de madres tratadas con Cd<sup>2+</sup>.

**Figura 3: Variación del peso semanal de F1 hembras.**



\*G3 con 30 ppm de Cd<sup>2+</sup>

Los parámetros reproductivos estudiados para medir el potencial de fertilidad de las F1 presentaron diferencias significativas tanto en los días de espera como en los días abiertos, siendo mayores en el G3 (tabla 9).

**Tabla 9: Características de fertilidad en las F1**

Grupo	Peso a la craza efectiva (g)	Tasa de fertilidad	Días de espera	Días abiertos
Control (n= 8)	235,1 ± 8,1	100%	2,5 ± 2,1 <sup>A</sup>	3,3 ± 2,3 <sup>B</sup>
Tratadas (n=8)	246,3 ± 3,2	65,5%	8,0 ± 1,7 <sup>a</sup>	7,8 ± 2,3 <sup>b</sup>

Resultados se expresan como promedio ± DE.

A ≠ a, p= 0,0007, B ≠ b, p = 0,006, Mann-Whitney.

Las F1 que presentaron cruce efectiva, al término de su preñez, se evaluó el número de crías y los pesos de las mismas, de cada grupo (tabla 10).

**Tabla 10: Características de las crías de las F1**

Grupo	Nº de crías/madre	Peso de las crías
Control	15 ± 1,3	3,55 ± 0,40
Tratadas	14,4 ± 1,3	3,53 ± 0,30

Resultados se expresan como promedio ±DE.

## Discusión

La primera fase del estudio tuvo como objetivo principal identificar la dosis menor de  $\text{Cd}^{2+}$  capaz de inducir un menor PN de los fetos; esta dosis resultó ser 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  (G4), no existiendo en los otros grupos diferencias significativas en el PN respecto al grupo control. Además, esta dosis sólo disminuyó el PN, sin afectar la talla, número de crías ni el peso de las placentas. Las dosis utilizadas en este estudio fueron seleccionadas de acuerdo a antecedentes de la literatura: para exposición crónica en el agua de bebida en ratas el NOAEL es de 0,005 mgCd/kg/día (Flaig y cols, 2003), la  $\text{DL}_{50}$  para ratas es de 88 mg/kg ( $\text{CdCl}_2$ ), y tienen un porcentaje de absorción intestinal de 5%, el que aumenta en ratas preñadas (Herba y cols, 2000) y por último los antecedentes descritos en la literatura sobre exposición a  $\text{Cd}^2$  en humanos que correlaciona dosis de 5 ppm, 15 ppm y 50 ppm con niveles de exposición bajo, moderado y ocupacional, respectivamente (Brzoska y cols, 2005). Con estos antecedentes, se eligieron las dosis de 3, 15, 30 y 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$  administrados como  $\text{CdCl}_2$  en el agua de bebida.

Se ha descrito que la absorción intestinal de  $\text{Cd}^{2+}$  en ratas es de aproximadamente un 5%, la que se realiza por un mecanismo mediado por un transportador de metales bivalentes DMT-1 presente en el tracto gastrointestinal (TGI). También se ha descrito que la absorción aumenta hasta casi el doble durante la preñez (Leazer y cols, 2002). De acuerdo al consumo diario de agua y a los niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  contenidos en el agua, se realizó un cálculo teórico de ingesta diaria de  $\text{Cd}^{2+}$ ; siendo ésta de aproximadamente 1,24 mg diarios en el grupo 4 expuesto a 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$ . Considerando un promedio de absorción a través del TGI de 10%, la cantidad absorbida por estas ratas sería aproximadamente unos 0,124 mg de  $\text{Cd}^{2+}$  diario y una cantidad total de 2,5 mg. Al analizar las concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  en placentas del G4, se obtuvo una acumulación de 0,00212 mg por g de placenta y dado que las placentas pesan en promedio 0,5 g, la acumulación total por placenta fue de 0,0011 mg, correspondiente al 0,044% de lo teóricamente absorbido por estos animales.

En relación a la exposición de trabajadores a cadmio en el ambiente, la legislación nacional ha desarrollado normativas. El decreto supremo 594 establece que por jornada de trabajo de 8 horas diarias y 5 días a la semana; la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  no debe ser mayor a  $0,008 \text{ mg/m}^3$  en el ambiente de trabajo, y en el consumo social (no ocupacional), una cajetilla de cigarrillos (20

unidades) aporta cerca de 16  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ . La dosis de cadmio entregada a las ratas del G4 supera a la permitida por la legislación en nuestro país y a la consumida normalmente de manera social. Cabe destacar, sin embargo, que la exposición laboral suele superar a la permitida y que en cuanto a salud pública, sólo se ha especificado la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  en el humo de tabaco, sin considerar la exposición a materiales, pinturas y baterías (Hogervorst y cols, 2006).

Se logró la reducción del PN de las crías en sólo uno de los grupos tratados (G4, con 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$ ), pero sin llegar a detectar la RCIU en el total del grupo. Sin embargo, hubo casos individuales de RCIU en todos los grupos de tratamiento, incrementándose este número en el grupo G4, llegando hasta un 13,2% del total de fetos, según la fórmula para RCIU aplicada en ratas (Neitzke y cols, 2007). Es importante comentar en este punto que la dieta administrada a los animales tiene elevadas concentraciones de zinc (Zn) y ácidos grasos de cadena corta omega 3 (DHA), ambos nutrientes son fundamentales en el crecimiento fetal sobre todo en el último período de la gestación (Hambidge, 2000; Smuts y cols, 2003), por lo que no se puede descartar que dietas con menores concentraciones de estos nutrientes pudieran haber inducido PN aún menores con 50 ppm de  $\text{Cd}^{2+}$ . Se conoce desde hace tiempo las propiedades protectoras de ambos elementos; estudios similares han establecido que el Zn es un elemento protector para los fetos, contrarrestando los efectos tóxicos del  $\text{Cd}^{2+}$ , efectos tales como RCIU, seguramente por competición por los canales de absorción o prolongando la vida útil de ciertos elementos con un rol antioxidante (Ahokas, 1979).

Durante la preñez no hubo diferencias en la variación de peso semanal de las madres con los distintos tratamientos. Sin embargo, los animales tratados disminuyeron el consumo de agua (sobre 15 ppm) lo cual puede explicarse por una baja palatabilidad del agua con  $\text{Cd}^{2+}$  para las ratas. La palatabilidad es un factor importante de consumo, tanto de agua como de alimento en los animales, un acostumbramiento al sabor desagradable puede con el tiempo eliminar la palatabilidad como factor de menor consumo, lo cual no ocurrió en este caso ya que no tuvieron un acostumbramiento previo al tratamiento con dosis menores a las entregadas. Se describe también que un consumo de agua restringido es un factor de estrés para los animales (Arnhold y cols, 2007), aunque no se les restringió el consumo de manera directa, la menor palatabilidad del agua representa una manera indirecta de restringir el consumo. Si se toma entonces la restricción del consumo de agua como un factor estresante, es posible entonces ligarlo con el aumento de los GC en estas ratas, y a su vez con la disminución del PN de sus fetos para la misma edad

gestacional (20 días). Sin embargo, esta posibilidad puede descartarse debido a que las madres de los grupos G2 y G3 también disminuyeron el consumo de agua no afectándose el PN de las crías. Si pensamos que el aumento en los GC induce menor PN, entonces deberíamos haber esperado crías con menor PN en todos los grupos donde el consumo de agua disminuyó considerablemente, lo que no se observó.

Debe destacarse que el consumo de alimento depende fuertemente del consumo de agua, y éste no fue diferente entre los grupos, en concordancia a antecedentes descritos previamente en la literatura con dosis de 50 ppm de CdCl<sub>2</sub> (Flaig y cols, 2003). Podemos concluir que en nuestro estudio el menor consumo de agua no modificó el consumo de alimentos. Esto se evidenció en los pesos de las madres, que resultaron ser iguales para todos los grupos durante todo el periodo de estudio.

Podemos concluir, entonces, que el efecto sobre el PN en el grupo tratado se debe directamente al tratamiento y no a un efecto ambiental externo. Los animales de todos los grupos se mantuvieron durante todo el estudio bajo las mismas condiciones ambientales (horas luz, temperatura, humedad y alimentación) siendo lo único diferente el tratamiento dado en el agua de bebida.

Las concentraciones de Cd<sup>2+</sup> encontradas en las placentas de las ratas tratadas indican una relación entre el Cd<sup>2+</sup> ingerido por el animal y el acumulado en la placenta; a mayor dosis de ingestión, mayor acumulación en las placentas. Es importante mencionar que no se encontró residuos de Cd<sup>2+</sup> en los fetos de animales tratados con 50 ppm durante la gestación (datos no mostrados), por lo que podemos concluir que el Cd<sup>2+</sup> no atraviesa la barrera placentaria, en consecuencia, la placenta constituye una barrera que protege al feto de la toxicidad a este metal. Esto sugiere que los efectos nocivos del Cd<sup>2+</sup> sobre el feto estarían mediados a través de alteraciones estructurales y fisiológicas del tejido placentario.

No observamos una asociación marcada entre el PN y la concentración de Cd<sup>2+</sup> acumulado en placenta, a diferencia de hallazgos en placenta humana donde la asociación negativa entre niveles placentarios de Cd<sup>2+</sup> y PN es elevada ( $r = -0,7$  en población general y  $-0,89$  en madres fumadoras, (Ronco y cols, 2005). Se puede argumentar que el PN estuvo protegido por componentes dietarios, los que disminuyeron la asociación.

Como se ha señalado en varias ocasiones, la placenta es fundamental en la mantención y desarrollo de la gestación, proveyendo soporte y nutrientes a los fetos; es por esto que cualquier daño en la placenta repercute inmediatamente en el adecuado desarrollo del feto. Las patologías placentarias se han asociado a RCIU y, por ende, a bajo PN, también se asocian con otras afecciones de la gestación como preeclampsia y aumento de GC. Los GC son hormonas esenciales para la adaptación metabólica de la madre, sobre la maduración y crecimiento fetal y se le atribuye un rol en el tiempo de parición (Burton y Waddell, 1999). Sin embargo, el exceso de GC produce una variedad de efectos deletéreos en el feto como: RCIU y efectos a largo plazo como: hipertensión, hiperglicemia, incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Odermatt y cols, 2006). Los GC principales son el cortisol y la corticosterona, las cuales se producen en diferente proporción según especies; así, en humanos el GC predominante es el cortisol, y en la rata es la corticosterona (Ganong, 2000). Sin importar el GC, éstos son regulados por la actividad de las enzimas  $11\beta$ -HSD1 para su activación y  $11\beta$ -HSD2 para su inactivación; ambas isoformas se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero la segunda se encuentra en abundancia en el tejido placentario tanto de humanos como roedores, siendo fundamental en la regulación del transporte de GC activos hacia el feto (Beek y cols, 2004).

En este estudio encontramos por primera vez que la exposición a  $Cd^{2+}$  durante la gestación produce un aumento de las concentraciones de corticosterona tanto en la madre como en el feto. Es probable que el aumento de corticosterona en la placenta de animales tratados con 50 ppm de  $Cd^{2+}$  altere la función de barrera de la placenta en relación a los GC, aumentando su transferencia al feto y una sobre exposición del feto a GC.

Dada la acumulación de  $Cd^{2+}$  en placenta podemos pensar que el mecanismo por el cual se produce un bajo PN en este grupo tratado es debido a un daño en la placenta, si además consideramos que las concentraciones de corticosterona encontrados en los fetos, madres y placentas de ambos grupos (grupo control y grupo 4) fueron significativamente distintos, siendo mayores en el grupo tratado. Los animales tratados con  $Cd^{2+}$  a una dosis de 50 ppm en comparación al grupo control, resultaron con concentraciones significativamente mayores de GC en las madres y crías y en todos los tejidos estudiados, vale decir, plasma materno, plasma fetal y placenta. Se ha reportado en la literatura una estimulación – inducida por  $Cd^{2+}$  - de la secreción de corticosterona en varias especies (Lall y Dan, 1999; Goulet y Hontela, 2003). Específicamente,  $Cd^{2+}$  activa fuertemente el eje pituitaria-adrenal aumentando las concentraciones de corticosterona

sugiriendo que la activación de la adrenal es dependiente de la presencia del  $\text{Cd}^{2+}$  en la sangre (Hidalgo y Armario, 1987). Un aumento de los corticosteroides pudiera estar involucrado en el menor PN de las crías expuestas a  $\text{Cd}^{2+}$  durante la gestación. Si se considera los resultados de este estudio (bajo PN, acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  en placenta y aumento de GC), a los cuales se añade el rol regulador de GC de la placenta, para proteger al feto de una sobre-exposición a estas hormonas (Burton y Waddell, 1999), podemos concluir que existe una anomalía en la regulación de los GC placentarios producto de la exposición a  $\text{Cd}^{2+}$ . Estudios *in-vitro* demuestran que una exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  reduce la actividad de la enzima  $11\beta$ -HSD2 (Yang y cols, 2005), enzima encargada de inactivar a los GC. Esta enzima aumenta su actividad en placenta durante la preñez, confirmando el rol protector ya antes mencionado (Burton y Waddell, 1999). Por otro lado, estudios de la literatura demuestran que en humanos un aumento en los GC lleva también a un aumento en la actividad de esta enzima, dado que los GC favorecen la estabilidad del mRNA de  $11\beta$ -HSD2, y, de esta manera existiría una autorregulación de los GC por esta enzima en placenta (Beek y cols, 2004). Hay que tener en cuenta que tanto los GC como la  $11\beta$ -HSD2 aumentan su actividad conforme avanza la gestación, lo cual nuevamente corrobora el rol protector de esta enzima para el feto.

El  $\text{Cd}^{2+}$  es un metal pesado que en los organismos puede funcionar como “*endocrine disruptor*”, siendo capaz de interferir en los procesos endocrinos, estimulando señales celulares, liberación de segundos mensajeros, e incluso puede simular los efectos de ciertas hormonas como estrógenos y afectar directamente la cadena de producción de ciertas hormonas, como las esteroidales (Liu y cols, 2008).

Uno de los mecanismos posibles por el cual el  $\text{Cd}^{2+}$  aumentaría la concentración de GC puede ser su efecto como *endocrine disruptor*. En este caso, no habría una alteración en la regulación enzimática de los GC, sino que una alteración en su vía metabólica. El  $\text{Cd}^{2+}$  como *endocrine disruptor* altera directamente la vía de la esteroidogénesis en varias etapas, disminuyendo, por ejemplo, la síntesis de progesterona durante la gestación (Henson y Chedrese, 2004; Schantz y Widholm, 2001). Hay que recordar que los GC comparten la misma vía de síntesis que la progesterona, desde un precursor común como es el colesterol y de éste a pregnenolona, para luego seguir la vía hacia los distintos esteroides (Ganong, 2000). Es posible que una alteración mediada por  $\text{Cd}^{2+}$  en esta vía provoque un aumento en los GC. Otra posibilidad es que el aumento de GC se deba a un incremento del estrés oxidativo, por acción del

$Cd^{2+}$  ya que este contaminante es capaz de sustituir minerales divalentes como Zn, Cu y Ca, afectando de este modo la actividad de las metaloenzimas. Además tiene fuerte afinidad con los grupos tiol (-SH); es así que este tóxico es capaz de producir sus efectos por la interacción con micro elementos como los ya mencionados (Ca, Zn, Cu, Fe y Se) (Chater y cols, 2008). El mecanismo exacto por el cual el  $Cd^{2+}$  produce un aumento en los GC *in vivo* no está esclarecido aún, pero por los resultados vistos en este estudio podría sugerirse entre los mecanismos el estrés oxidativo o la capacidad de *endocrine disruptor* que posee este contaminante, sin descartar una acción conjunta de ambos mecanismos.

Si bien los antecedentes de la literatura que demuestran que los efectos estimulatorios de los GC sobre la  $11\beta$ -HSD2 fueron observados en células de trofoblasto humano en cultivo, al igual que los efectos inhibitorios de  $Cd^{2+}$  sobre la expresión y actividad de la enzima, la principal explicación, más que adjudicarla a las diferencias entre especies de ambos estudios, podría deberse a que este estudio fue realizado *in vivo*. Un aumento de las concentraciones de  $Cd^{2+}$  estimula la síntesis y secreción de corticosterona, produciendo una “activación” de la enzima, la que es contrarrestada por los efectos inhibitorios directos de  $Cd^{2+}$  sobre la enzima.

En resumen, la actividad de la enzima  $11\beta$ -HSD2 no se ve modificada en forma significativa como resultado de la acción contrapuesta de  $Cd^{2+}$  y GC sobre la enzima.

El potencial reproductivo sólo se midió en las hembras, dado que los antecedentes de la literatura señalan a la hembra como la más afectada a la exposición de este metal (Vahter y cols, 2007). Aún cuando los fetos no son expuestos directamente al  $Cd^{2+}$ , fue posible identificar deficiencias en la fertilidad de las hijas de las madres tratadas. Si se toma en cuenta que el periodo de tiempo de cruzamiento fue el mismo para cada una de las ratas en estudio (independiente de su fecha de nacimiento) y las condiciones ambientales las mismas para todas ellas; se obtiene un resultado importante en cuanto a la fertilidad de estas ratas, que se encuentra disminuida, sin haber tenido una exposición directa al tóxico, puede deberse entonces al aumento de los GC relacionado con el  $Cd^{2+}$  durante la gestación. Debemos señalar que esta parte del estudio no se realizó con la dosis mayor de  $Cd^{2+}$ , sino que con sólo 30 ppm, debido a que no sabíamos al momento del diseño experimental qué concentración produciría un menor PN y además conseguiría la sobrevivencia de las crías, ya que esta fase se realizó en paralelo a las otras del estudio. Un resultado interesante fue descubrir que sin encontrar anomalías visibles al nacimiento,

como puede ser un menor PN, estos animales sí fueron afectados por el tratamiento al menos en el aspecto de la fertilidad. Como se ha mencionado en este trabajo, son conocidos los efectos sobre plasticidad metabólica (o RF) de los GC y del  $Cd^{2+}$ , y también se conocen los efectos directos sobre la fertilidad en animales de laboratorio y también humanos de este metal (Levengood y Heske, 2008), pero siempre con acción directa sobre el individuo, y no a través de la gestación. En hombres se conoce la relación de este metal con infertilidad, producto de oligozoospermia (número disminuido de espermatozoides) y astenozoospermia (espermatozoides con movimiento lento y de poca fertilidad) y en hembras se produce una disminución marcada en la concentración de progesterona con altas dosis de  $Cd^{2+}$  (Akinloye y cols, 2006; Henson y Chedrese, 2004). Entonces no es de extrañar que un tratamiento con  $Cd^{2+}$  produzca un deterioro en la fertilidad, lo que sí hay que destacar, nuevamente es que esta fertilidad disminuida fue producto de un tratamiento durante la gestación, y en el cual estos individuos no tuvieron contacto directo con el tóxico, como ya se ha señalado, con dosis de  $Cd^{2+}$  mayores a esta, no se encontraron niveles detectables del metal en los fetos. La posibilidad de una ingesta de  $Cd^{2+}$  durante la lactancia ya se ha descartado, dado que en otros estudios del laboratorio se ha analizado la leche de estas ratas sin encontrar niveles detectables de este metal, por lo cual podemos llegar a concluir que los efectos en la fertilidad de estas F1 se deben al tratamiento prenatal entregado a las madres.

Las variables medidas en estas ratas como: tasa de fertilidad, días de espera y días abiertos, resultaron ser significativamente distintos que en los controles, sin haber diferencias en los pesos y tamaño de camada. Los días de espera nos indican que estas ratas resultaron ser más tardías en presentar la ciclicidad ovárica que sus controles; se entiende entonces que alguna alteración durante su vida prenatal reprogramó a estos animales para presentar su capacidad sexual de manera más tardía. Los días abiertos son importantes de señalar, ya que se midieron sólo en las ratas que presentaron ciclicidad; un aumento de estos días indica directamente un problema de fertilidad, puesto que presentando el ciclo sexual, no conseguían un cruzamiento en el mismo periodo de estro. Estas dos variables, días de espera y días abiertos, se midieron para todas las ratas en la misma edad y en el mismo periodo de tiempo y, entonces, nos entregaron en conjunto una tasa de fertilidad, que corresponde al número de hembras que se cruzó efectivamente (con parición) en ese periodo de tiempo, la cual fue menor en el grupo de las tratadas prenatalmente, siendo un 35% menor que el grupo control. Los mecanismos por los cuales ocurre esta

disminución de la fertilidad en el grupo tratado son desconocidos; puede deberse a la RF producto del exceso de GC durante la vida prenatal.

Estos resultados nos sugieren, entonces, que los efectos tóxicos del  $\text{Cd}^{2+}$  no sólo se manifiestan a nivel fetal y neonatal sino que también pueden producirse a largo plazo, en la vida adulta del animal.

## Conclusiones

- 1- La exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  durante la preñez ( 50 ppm) afecta el correcto desarrollo del feto, disminuye el PN de las crías, aumentando el porcentaje de RCIU.
- 2- Estos efectos adversos tienen relación con un aumento de la exposición fetal a GC.
- 3- Los efectos observados parecen ser una consecuencia indirecta del  $\text{Cd}^{2+}$  debido a que no atraviesa la placenta dado que no encontramos concentraciones traza de este metal en los fetos.
- 4- La exposición a dosis de  $\text{Cd}^{2+}$  (30 ppm) que no afectan el PN pueden afectar el potencial reproductivo de las crías hembra en su vida adulta.

## Bibliografia

- **AHOKAS, R.** 1979. Cadmium-induced fetal growth retardation: Protective effect of excess dietary zinc. *Obstet. Gynecol.* 136:216.
- **AKINLOYE, O; AROWOJOLU, A; SHITTU, O; ANETOR, J.** 2006. Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive Biology* 6:1.
- **ARNHOLD, M; WOTUS, C; ENGELAND, W.** 2007. Differential regulation of parvocellular neuronal activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following single vs. repeated episodes of water restriction-induced drinking. *Experimental Neurology.* 206: 126-136.
- **BEEK, J; GUAN, H; JULAN, L; YANG, K.** 2004. Glucocorticoids Stimulate the Expression of 11- Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Cultured Human Placental Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5614–5621
- **BRZOSKA, M; MAJEWSKA, K; MONIUSKO-JAKONIUK, J.** 2005. Weakness in the mechanical properties of the femur of growing female rats exposed to cadmium. *Arch Toxicol,* 79: 277-288.
- **BURTON, P; WADDELL, B.** 1999. Dual Function of 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action. *Biology of Reproduction* 60, 234–240.
- **CHATER, S; DOUKI, D; GARREL, C; FAVIER, A; SAKLY, M; ABDELMELEK, H.** 2008. Cadmium-induced oxidative stress and DNA damage in kidney of pregnant female rats. *C. R. Biologies* 331: 426–432.
- **ESCHER, G; VOGT, B; BECK, T; GUNTERN, D; FREY, B; FREY, F.** 1998. Reduced 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in the Remaining Kidney Following Nephrectomy. *Endocrinology* 139: 1533-1539.

- **FERNÁNDEZ, E; GUSTAFSON, A; ANDERSSON, M; HELLMAN, B; DENCKER, L.** 2003. Cadmium-Induced Changes in Apoptotic Gene Expression Levels and DNA Damage in Mouse Embryos Are Blocked by Zinc. *Toxicological Sciences* 76, 162–170.
- **FLAIG, K; SHUMANN, K; ELSENHANS, B.** 2003. Jejunal transfer rates of 109-cadmium chloride increase in rats in vitro and in vivo after oral pretreatment with cadmium or zinc chloride. *Toxicology*, 183: 199-209.
- **GANONG, W.** 2000. *Fisiología Médica. 17ª Edición, Manual Moderno Mexico.* 20: 399-402.
- **GICQUEL, C.** 2008. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 22, No. 1, pp. 1–16.
- **GODFREY, K; BARKER, D.** 2001. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 4: 611-624.
- **GOULET, B; HONTELA, A.** 2003. Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2106-2113.
- **HAMBIDGE M.** 2000. Human zinc deficiency. *J Nutrition* 130(5S Suppl):1344S-9S.
- **HENSON, M.; CHEDRESE, J.** 2004. Endocrine disruption by cadmium a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Biol Medical* 229:383-392.
- **HERBA, E; PODJA-WILCZEK, D; PODJA, S; BRUS, R; PLEACH, A.** 2000. The effect of prenatal exposure to cadmium on flash visual evoked potentials in rat offspring before and after injection of norepinephrine into the lateral brain ventricle. *Klin Oczna.* 102: 233-236.
- **HIDALGO, J; ARMARIO, A.** 1987. Effect of Cd administration on the pituitary –adrenal axis. *Toxicology.* 45, 113-116.

- **HOGERVORST, J; PLUSQUIN, M; VANGRONSVELD, J; NAWROT, T; CUYPERS, A; HECKE, E; ROELS, H; CARLEER, R; STAESSEN, J.** 2006. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environmental Research* 103: 30–37.
  
- **HUANG, D; ZHANG, Y; QI, Y; CHEN, C; JI, W.** 2008. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicology Letters* 6535.
  
- **JÄRUP, L.** 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 2003; 68: 167–182
  
- **KALTENECKER, E; WAISSMANN, W.** 2006. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 22(3):485-493.
  
- **KIM, S; KWON, H; CHEONG, H; CHOI, K; JANG, J; JEONG, W; KIM, D; YU, S; KIM, Y; LEE, K; YANG, S; JHUNG, I; YANG, W; HONG, Y.** 2008. Investigation on Health Effects of an Abandoned Metal Mine. *J Korean Med Sci.* 23(3): 452–458.
  
- **LALL, S; DAN, G.** 1999. Role of corticosteroids in cadmium induced immunotoxicity. *Drug Chem. Toxicol.* 22, 401-409.
  
  
- **LEAZER, T; LIU, Y; KLASSEN, C.** 2002. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. *Toxicology Appl Pharmacol.* 185: 18-24.
  
- 
  
- **LEVENGOOD, J; HESKE, E.** 2007. Heavy metal exposure, reproductive activity, and demographic patterns in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a contaminated floodplain wetland. *Science of the total Environment* 389:320–328.

- **LIU, Z; YU, X; SHAIKH, Z.** 2008. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228:286–294.
  
- **MICHAELI, A; PAPAGEORGHIU, A.** 2008. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Human Reproduction Update*, pp. 1–21.
  
- **MORENO, J; DALMAU, J.** 2001. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que una hipótesis?. *Acta Pediatrica Española*, vol 59, N° 10.
  
- **NEITZKE, U; HARDER, T; SCHELLONG, K; MELCHIOR, K; ZISKA, T; RODEKAMP, E; DUDENHAUSEN, J; PLAGEMANN, A.** 2008. Intrauterine Growth Restriction in a Rodent Model and Developmental Programming of the Metabolic Syndrome: A Critical Appraisal of the Experimental Evidence. *Placenta* 29: 246-254.
  
- **ODERMATT, A; GUMY, C; ATANASOV, A; DZYAKANCHUK, A.** 2006. Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 102: 222–231.
  
- **PIASEK, M.; BLANUSA, M.; KOSTIAL, K.; LASKEY, J.** 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod Toxicol* 15:673-681.
  
- **RONCO, A.; ARGUELLO, G.; MUÑOZ, L.; GRAS, N.; LLANOS, M.** 2005. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Bio Metals* 18:233-241.
  
- **SCHOOF, E; GIRSTL, M; FROBENIUS, W; KIRSCHBAUM, M; DO" RR, H; RASCHER, W; DO" TSCH, J.** 2001. Decreased Gene Expression of 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase in Human Placenta of Patients with Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86-3.

- **SHANTZ, S; WIDHOLM, J.** 2001. Cognitive Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Animals. *Environmental Health Perspectives*. 109:12.
  
- **SMUTS, C; BOROD E; PEEPLES J; CARLSON S.** 2003. High-DHA eggs: feasibility as a means to enhance circulating DHA in mother and infant. *Lipids* 38:407-14.
  
- **SOLTIS, D; SOLTIS, P; ENDRESS, P; CHASE, M.** 2005. Phylogeny and evolution of angiosperms. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 104-109.
  
- **STUMPF, C; LABARRAQUE, G.** 2005. La métrologie analytique inorganique par spectrométrie de masse ICP/MS; seconde phase de développement. *Revue française de métrologie*, vol. 2005-1, no. 1, pp 7-17.
  
- **SURU, S.** 2008. Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Bio Metals* 10534-008-9148-5.
  
- **VAHTER, M; AKESSON, A; LIDÉN, C; CECCATELLI, S; BERGLUND, M.** 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research* 104: 85–95.
  
- **WIER, P; MILLER, R.** 1987. The pharmacokinetics of cadmium in the dually perfused human placenta. *Trophoblast Res* 2: 357-366.
  
- **YANG, K; JULAN, L; RUBIO, F; SHARMA, A; GUAN, H.** 2005. Cadmium reduces 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E135-E142.

## **ANEXO:**

### **Carta del Comité de Bioética Animal INTA.**



www.inta.cl  
CASILLA 138 -11  
SANTIAGO - CHILE  
FAX: (56) 2 - 221 - 4030  
TELEFONOS: 978 1400 - 978 1405  
978 1467 - 978 1416  
978 1401 - 978 1497

UNIVERSIDAD DE CHILE  
INSTITUTO DE NUTRICION  
Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS



UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES  
UNIDAS  
UNIDAD DE INVESTIGACION  
Y DOCENCIA

Santiago, 14 de Septiembre de 2006

Srs  
Subcomité Concurso Nacional  
Proyectos Fondecyt  
Concurso Regular 2007  
Presente

Estimados Srs:

Quien suscribe, Presidente del Comité de Bioética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos para la Experimentación en Animales, declara que, junto con los demás miembros de este comité, los Drs. Alejandro Hernández K. y Rubén Soto-Moyano, ha conocido y analizado el proyecto: **"La exposición prenatal a cadmio como factor de reprogramación fetal; una consecuencia de las modificaciones epigenéticas sobre el gen HSD11B2 placentario"** La investigadora responsable de este proyecto es la profesora Dra Ana María Ronco M. en su calidad de miembro académico del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

El proyecto en cuestión se rige en lo esencial por normas del National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Publicación Nº 85-23 (revisada) National Institute of Health, Bethesda, Maryland, 1985 y del Informe del año 2000 sobre Eutanasia en Animales de Laboratorio, emanado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001; 218: 669-696). Estos documentos han sido estudiados por este comité, que ha acogido sus normativas como propias. Esto sumado a antecedentes adicionales aportados por la investigadora responsable de este proyecto en una conversación pertinente, permite a este comité aprobar sin cambios substanciales la metodología propuesta en este estudio.

Atentamente

Prof. Miguel Llanos Silva  
Presidente del Comité de Bioética  
Para la Experimentación en Animales  
INTA. Universidad de Chile