



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

**EXPOSICIÓN PRENATAL A CADMIO COMO FACTOR DE
REPROGRAMACIÓN FETAL CARDIOVASCULAR EN UN
MODELO DE ROEDOR**

MARCELA MONTENEGRO HERRERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. ANA MARÍA RONCO M.

SANTIAGO, CHILE
2009



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

**EXPOSICIÓN PRENATAL A CADMIO COMO FACTOR DE
REPROGRAMACIÓN FETAL CARDIOVASCULAR EN UN
MODELO DE ROEDOR**

MARCELA MONTENEGRO HERRERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: ANA MARÍA RONCO MACCHIAVELLO
PROFESOR CONSEJERO	: MARÍA SOL MORALES SILVA
PROFESOR CONSEJERO	: BETTY SAN MARTÍN NUÑEZ

SANTIAGO, CHILE
2009

A mi profesora guía, Dra. Ana María Ronco, por el apoyo, confianza y estímulo a lo largo de mi Tesis.

A los miembros del Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile, por su apoyo y constante colaboración, en especial a Manuel, compañero y amigo.

A los integrantes del departamento de Neurofarmacología de la Facultad de Medicina, por su contribución y ayuda.

A mi familia y amigos, por su constante aliento, confianza, paciencia y amor.

A Dios.

Y especialmente, a mi abuelo, mi tata, Aurelio.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
FINANCIAMIENTO	VIII
INTRODUCCIÓN	
1. Ambiente materno y Reprogramación fetal	1
1.1 Reprogramación fetal cardiovascular	3
1.2 Mecanismos de reprogramación fetal	4
2. Cadmio	5
2.1 Exposición medio ambiental e ingreso al organismo	5
2.2 Efectos en el organismo de la exposición crónica a cadmio	8
2.3 Efectos en el sistema cardiovascular	11
3. Endotelio vascular y disfunción	14
3.1 Moléculas relacionadas con el daño endotelial: VCAM-1, 8-isoprostano, VEGF y HO-1.	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Modelo de estudio	20
2. Diseño experimental	21
3. Determinación de la concentración de cadmio	25
4. Determinación de la reactividad vascular	25

	Páginas
5. Determinación de la concentración de 8- isoprostano	28
6. Determinación de la concentración de VEGF	31
7. Determinación y cuantificación del mRNA del gen HO-1 y VCAM-1	34
8. Análisis estadístico	36

RESULTADOS

1. Evaluación de algunos parámetros de las madres	37
2. Evaluación de algunos parámetros de las crías	38
3. Determinación de la concentración de cadmio	38
4. Determinación de la reactividad vascular	39
4.1 Reactividad vascular endotelio- dependiente	39
4.2 Reactividad vascular endotelio- independiente	42
5. Determinación de la concentración de 8- isoprostano	45
6. Determinación de la concentración de VEGF	47
7. Determinación y cuantificación del mRNA del gen HO-1 y VCAM-1	49

DISCUSIÓN	52
------------------	----

CONCLUSIONES	61
---------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	63
---------------------	----

ANEXO

1. Composición de la solución Krebs-Henseleit modificada (KHm), utilizada en la medición de la reactividad vascular.	79
2. Protocolo y especificidad del Análisis Inmuno-enzimático (EIA) utilizado para la determinación de 8-isoprostano.	80
3. Protocolo del Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizado para determinar el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).	84
4. Protocolo de la técnica Real Time RT-PCR utilizada para la determinación y cuantificación del mRNA del gen HO-1 y VCAM-1.	87
5. Carta del Comité de Bioética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.	91

ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

AP-1: Factor activado de proteína 1

Cd²⁺: Cadmio

CO: Monóxido de carbono

CO₂: Dióxido de carbono

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario

DCM: Cardiomiopatía dilatada

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DL₅₀: Dosis semiletal, miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso de un animal para matar al 50% de la población.

DMT1: Transportador de metales divalentes duodenal

DNA: Acido desoxirribonucleico

DNAsa: Desoxirribonucleasa

dNTPs: Desoxinucleótido trifosfato

EDTA: Ácido etilén diaminotetraacético

EIA: Análisis Inmuno-enzimático

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

GPx: Enzima glutatión peroxidasa

HO-1: Enzima HEM oxigenasa tipo 1

IgG: Inmunoglobulina G

KHm: Solución Krebs-Henseleit modificada

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MT: Metalotioneina

NA: Noradrenalina

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintetasa

NPS: Nitroprusiato sódico

NTG: Nitroglicerina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pb: Pares de bases
ppm: Partes por millón
RCIU: Retardo del crecimiento intrauterino
RF: Reprogramación fetal
ROS: Especies reactivas del oxígeno
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Transcriptasa reversa
SOD: Enzima superóxido dismutasa
Tm: Temperatura media de fusión o *melting*
VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1
VEGF: Factor de crecimiento de endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURAS	Páginas
Figura 1: Sexaje de las crías	22
Figura 2: Esquema del sistema utilizado para la determinación de la reactividad vascular	26
Figura 3: Esquema del fundamento del EIA utilizado para la determinación de 8-isoprostano	29
Figura 4: Esquema del fundamento del ELISA utilizado para la determinación de VEGF	32
Figura 5: Análisis de la curva de desnaturalización para β -actina	49
Figura 6: Análisis de la curva de desnaturalización para HO-1	50
Figura 7: Análisis de la curva de desnaturalización para VCAM-1	50
Figura 8: Esquema de las diluciones en serie de la curva estándar del “kit” EIA 8 -isoprostano	82
Figura 9: Esquema de las diluciones en serie de la curva estándar del “kit” ELISA VEGF.	85
Figura 10: Pellet de RNA	88
Figura 11: Equipo <i>Lightcycler</i> de Roche	90
TABLAS	Páginas
Tabla 1: Análisis químico proximal del alimento	20
Tabla 2: Cuadro resumen del diseño experimental	24
Tabla 3: Cuadro resumen del protocolo de reactividad vascular	27
Tabla 4: Partidores (sentido/ antisentido) del gen β -actina, HO-1 y VCAM-1, temperatura de fusión (T_m) y número de pares de bases del producto.	35
Tabla 5: Peso corporal y consumo de agua y alimento de las madres del grupo control y del grupo tratado con Cd^{2+} , desde el momento de la cruce hasta la cesárea y parto.	37

	Páginas
Tabla 6: Numero de crías, peso corporal de las crías, talla de las crías y peso de las placentas del grupo control y del grupo tratado con Cd ²⁺ .	38
Tabla 7: Concentración de cadmio	39
Tabla 8: Curva de relajación endotelio-dependiente inducida por ACh	40
Tabla 9: Curva de relajación endotelio- independiente inducida por NPS	43
Tabla 10: Valores de la curva estándar del 8-Isoprostano	46
Tabla 11: Valores de la curva estándar VEGF	47
Tabla 12: Contenido del “kit” EIA 8-isoprostano (Cayman Chemical)	80
Tabla 13: Especificidad del “kit” EIA 8-isoprostano (Cayman Chemical)	80
Tabla 14: Especificidad del “kit” ELISA VEGF (R&D Systems)	84

GRÁFICOS

Páginas

Gráfico 1: Curva estándar del “kit” EIA 8- isoprostano	30
Gráfico 2: Curva estándar del “kit” ELISA VEGF	33
Gráfico 3: Relajación inducida por ACh de anillos aórticos de ratas adultas del grupo control	40
Gráfico 4: Relajación inducida por ACh de anillos aórticos de ratas adultas del grupo cadmio	41
Gráfico 5: Relajación inducida por ACh de anillos aórticos de ratas adultas macho del grupo control y cadmio	41
Gráfico 6: Relajación inducida por ACh de anillos aórticos de ratas adultas hembra del grupo control y cadmio	42
Gráfico 7: Relajación inducida por NPS en anillos aórticos de ratas adultas del grupo control	43
Gráfico 8: Relajación inducida por NPS en anillos aórticos de ratas adultas del grupo cadmio	44

	Páginas
Gráfico 9: Relajación inducida por NPS en anillos aórticos de ratas adultas macho del grupo control y cadmio	44
Gráfico 10: Relajación inducida por NPS en anillos aórticos de ratas adultas hembra del grupo control y cadmio	45
Gráfico 11: Curva estándar 8-Isoprostano	46
Gráfico 12: Curva estándar VEGF	48
Gráfico 13: Expresión cuantitativa de mRNA de HO-1, mediante PCR a tiempo real en tejido aórtico de ratas adultas hembra (H) y macho (M) del grupo control y del grupo tratado con cadmio durante la gestación.	51
Gráfico 14: Expresión cuantitativa de mRNA de VCAM-1, mediante PCR a tiempo real en tejido aórtico de ratas adultas hembra (H) y macho (M) del grupo control y del grupo tratado con cadmio durante la gestación.	51

RESUMEN

Una alteración del ambiente materno durante la gestación puede originar una readecuación fisiológica en el feto llamada “reprogramación fetal” (RF), con consecuencias funcionales adversas a largo plazo. La exposición prenatal a cadmio (Cd^{2+}) puede generar un ambiente adverso a nivel placentario debido a que se acumula en la placenta induciendo menor peso de nacimiento de las crías. Esta hipótesis propone que la exposición a Cd^{2+} durante la gestación induce RF la que se manifiesta en una disfunción endotelial vascular en las crías en la edad adulta.

Ratas vírgenes hembra Wistar fueron cruzadas y expuestas a Cd^{2+} en el agua de bebida (30 ppm de Cd^{2+} como CdCl_2) durante el período de gestación (21 días). Después del parto, las crías se mantuvieron en condiciones normales hasta la adultez (60 días). A esa edad se extrajeron los anillos aórticos y se determinó la reactividad vascular endotelio-dependiente (parámetro de función endotelial) y endotelio- independiente, y marcadores moleculares de factores de inflamación (VCAM-1) y estrés (HO-1), así como marcadores plasmáticos de angiogénesis (VEGF) y estrés oxidativo (8-isoprostano). El tejido aórtico de las ratas adultas expuestas a Cd^{2+} durante la gestación mostró una respuesta disminuida de relajación inducida por acetilcolina, indicando daño endotelial. Este efecto se manifestó tanto en hembras como en machos. No se detectó niveles de VEGF ni 8-isoprostano circulante ni en los animales controles ni tratados *in útero*. La expresión de VCAM-1 (mRNA) fue mayor en machos que en hembras y no se modificó con el tratamiento. El mRNA de HO-1 aumentó en aortas de animales tratados *in útero*, tanto en machos como en hembras aunque el efecto fue mayor en las hembras. No se detectó Cd^{2+} (ICP-MS) ni en tejidos fetales ni en leche materna aunque sí en placenta, lo que indica que este metal tóxico no traspasa la barrera placentaria ni tampoco se transfiere a las crías a través de la lactancia.

Concluimos que la exposición prenatal a Cd^{2+} es un factor de RF porque induce, a largo plazo, una disfunción endotelial del tejido aórtico, proceso inicial característico de enfermedad cardiovascular. Se sugiere que estos efectos están mediados, en parte, por una alteración en la expresión de HO-1, gen inducible por Cd^{2+} y estrés, la que se genera por un efecto indirecto de Cd^{2+} , que al acumularse en la placenta, altera su fisiología y funcionalidad.

Financiamiento: Fondecyt N° 1071110.

ABSTRACT

An adverse maternal environmental during gestation may induce a fetal physiological re-adaptation called “fetal programming” (RF), with adverse functional characteristics at long time. Prenatal exposure to cadmium (Cd^{2+}) could induce an adverse environment at placental level since it is accumulated in placental tissues inducing lower birth weight in the offspring. This hypothesis suggests that Cd^{2+} exposure during gestation induce RF which is manifested in vascular endothelial dysfunction of adult offspring.

Wistar virgin adult female rats were mated and exposed to Cd^{2+} as CdCl_2 in drinking water (30 ppm of Cd^{2+}) during the whole pregnancy period (21 days). After delivery, offspring were maintained under normal conditions until adult age (60 days old). At this age, aortic rings were extracted and endothelium –dependant (a parameter of endothelial function) and independent vascular reactivity were determined. In addition, aortic molecular markers of inflammation (VCAM-1) and stress (HO-1), and plasmatic markers of angiogenesis (VEGF) and oxidative stress (8-isoprostanes) were measured. Results of vascular reactivity showed a decreased response to acetylcholine in aortic tissues of adult rats exposed to Cd^{2+} during gestation compared to control rats, suggesting endothelial damage. This effect was present in males as in females. Plasmatic VEGF and 8-isoprostanes levels were not detected in control as *in útero* treated animals. Males showed higher VCAM-1 mRNA expression than females, but this expression was not altered by the Cd^{2+} treatment. HO-1 mRNA was higher in aortas from *in útero* treated animals in males as in females, although this effect was higher in females. Cd^{2+} (ICP-MS) was not detected in fetal tissues and in maternal milk, but was found in placenta, indicating that this metal does not cross placental barrier. Cd^{2+} was also not transferred through maternal lactation.

We conclude that prenatal exposure to Cd^{2+} could be considered as a RF factor since; it induces, at long time, an endothelial dysfunction in aortas, an initial process of cardiovascular disease. It is suggested that these effects are mediated, in part, through altered expression of HO-1, a Cd^{2+} and stress-induced gene. This alteration could be generated by an indirect effect of Cd^{2+} , which is accumulated in placenta altering its function and physiology.

Support: Fondecyt N° 1071110.

FINANCIAMIENTO

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, Universidad de Chile. Se desarrolló en el marco del proyecto FONDECYT 1071110 y la investigadora responsable es la Dra. Ana María Ronco Macchiavello.

INTRODUCCIÓN

1. Ambiente materno y Reprogramación Fetal

El feto en gestación es absolutamente dependiente del ambiente materno para su desarrollo y crecimiento el que dependerá de una variedad de influencias y estímulos externos que actúan en las distintas etapas del desarrollo desde la concepción hasta el nacimiento (Godfrey y Barker, 2001).

Durante mucho tiempo se consideró que el feto en etapa de desarrollo *in útero* se encontraba exento de sufrir algún daño por agentes externos, pues se suponía que estaba protegido dentro del vientre materno. En 1940 Gregg y su grupo describieron que el virus de la rubéola durante el embarazo producía defectos congénitos en el recién nacido. De ahí en adelante comenzó el estudio de los factores ambientales, internos o externos, que originaban los defectos congénitos (Martínez, 2008).

Para un desarrollo fetal normal, el desarrollo apropiado de la placenta es crucial. La placenta es el regulador de la composición nutricional y es proveedor de la madre al feto de señales hormonales que afectan el metabolismo materno y fetal. La placenta tiene varias funciones: actúa como barrera inmunológica entre la madre y el feto, sirve para transportar los alimentos y residuos entre la madre y feto y es una fuente de muchas hormonas peptídicas y esteroidales que influyen el metabolismo y el desarrollo fetal, placentario y maternal (Myatt, 2006).

Una alteración del ambiente materno originado por un estímulo inadecuado o insulto precoz en un período sensible del desarrollo fetal, puede originar una readecuación fisiológica en el feto con consecuencias funcionales adversas a largo plazo (Godfrey y Barker, 2001). A este fenómeno se le ha denominado “reprogramación fetal” (RF) (Lucas, 1991) y las primeras evidencias epidemiológicas fueron reportadas por Barker, quien logró establecer que un cierto patrón de desarrollo intrauterino como es el retardo de crecimiento intrauterino (RCIU) se relacionaba con una mayor incidencia de patologías específicas en la vida postnatal tales como enfermedad cardiovascular, obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemias y alteraciones reproductivas, independientemente del origen étnico, edad y sexo (Barker y Clark, 1997). El feto, ajusta su desarrollo a las condiciones intrauterinas

adversas para poder sobrevivir, sin embargo, esta adaptación puede colocar al individuo en situación de riesgo de enfermedades más adelante en la vida si hay un desfase entre el medio ambiente fetal y postnatal. Un genotipo dado puede, por tanto, dar lugar a distintos fenotipos dependiendo de las condiciones ambientales. Esta asociación fue inicialmente denominada "programación fetal", ya que estas consecuencias permanentes negativas en etapas posteriores de la vida son inducidos por la deprivación nutricional durante un período crítico. Ahora se prefieren los términos de "desarrollo o plasticidad metabólica" (Gicquel, 2008).

Los efectos adversos provocados por insultos ambientales en la vida temprana han sido documentados extensamente en estudios epidemiológicos (Godfrey y Barker, 2000; 2001), en animales (Bertram y Hanson, 2001), en tipos celulares específicos (Heywood *et al.*, 2004) y embriones (Kwong *et al.*, 2000). En todos los estudios realizados, la conclusión común más sólida es la importancia de la placenta en los efectos observados. La placenta está en una posición dominante para desempeñar un papel directo en la programación fetal, es decir cambiando el patrón de señales (hormonales) de desarrollo al feto o cambiando el patrón o la cantidad de sustrato transportado al feto de forma que el desarrollo fetal es alterado, conduciendo en última instancia a una enfermedad cardiovascular o metabólica más adelante en la vida adulta (Myatt, 2006). La función placentaria evoluciona cuidadosamente a través de la gestación. La interrupción del patrón normal del desarrollo placentario conducirá obviamente a una placenta con la función alterada (Myatt, 2006). Perturbaciones en el ambiente materno puede afectar el estado de metilación de genes de la placenta y aumentar el estrés oxidativo / nitrativo, lo que resulta en cambios en la función placentaria (Jansson y Powell, 2007).

De esta forma la hipoxia, el estrés oxidativo y nitrativo que alteran el desarrollo de la placenta pueden ser un mecanismo subyacente general que relaciona la función placentaria alterada con la programación fetal (Myatt, 2006).

El estímulo, insulto o agresiones en las etapas tempranas de la vida puede originarse por medios endógenos (señalización hormonal) o exógenos (medio ambiente) (Martínez, 2008). El momento, la duración, la gravedad y el tipo de insulto durante el desarrollo determinan el resultado fisiológico específico. La programación intrauterina de los sistemas fisiológicos ocurre a nivel de gen, célula, tejido, órgano, y sistema y causa cambios

permanentes estructurales y funcionales, que pueden conducir a la enfermedad manifiesta, en particular con el aumento de la edad (Fowden *et al.*, 2006).

Actualmente, los principales insultos o factores prenatales estresantes conocidos incluyen alimentación inadecuada, hipoxia y exceso de glucocorticoides. Otros agentes tienen aún que ser descubiertos, los agentes químicos presentes en el medio ambiente pueden ser también importantes agentes de programación (Louey y Thornburg, 2005). Las evidencias actuales provienen principalmente de estudios en modelos animales como rata, ratón, oveja y conejo, sometidos a diferentes ambientes adversos *in útero* incluyendo insuficiencia placentaria (Zhang *et al.*, 2000), hipoxia crónica (Longo y Pearce, 2005), restricción alimentaria global (Woodall *et al.*, 1996), dietas de bajo contenido proteico (Ozanne *et al.*, 1998; 2003; Langley-Evans *et al.*, 1996 a,b; 2000), elevada ingesta de grasas (Koukkou *et al.*, 1998; Koumentaki *et al.*, 2002; Armitage *et al.*, 2004), desnutrición o sobrenutrición (McMillen y Robinson, 2005), reducida ingesta de micronutrientes como hierro y folatos, y tratamiento prenatal con glucocorticoides (Wintour *et al.*, 2003).

1.1 Reprogramación Fetal Cardiovascular

Varios estudios sugieren que los eventos adversos durante la vida fetal pueden programar enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. Barker identificó una relación entre el bajo peso al nacer y un mayor riesgo de hipertensión arterial, arteriosclerosis carotídea y mortalidad por enfermedad coronaria o un derrame cerebral en la edad adulta. Estos hallazgos dieron lugar a la hipótesis "origen fetal", y es que las enfermedades cardiovasculares se originan en las adaptaciones a un medio ambiente intrauterino adverso. Tal adaptación podrá alterar permanentemente la estructura y la fisiología cardiovascular a través del proceso de programación (Tauzin *et al.*, 2005). Estudios más recientes han investigado la influencia del entorno prenatal sobre los mecanismos de programación como la disfunción del endotelio y el metabolismo lipídico anormal. Hay evidencia de crecimiento, de que un entorno prenatal pobre puede llevar a la vulnerabilidad de enfermedad sin afectar el peso del nacimiento (Louey y Thornburg, 2005).

Numerosos estudios, en los que se han usado una variedad de especies animales y protocolos experimentales muestran que el estrés antes del nacimiento lleva a una función deprimida del endotelio en las crías y que esos deterioros contribuyen al desarrollo de la

enfermedad cardiovascular. Además de las respuestas atenuadas a los agentes vasodilatadores, la disfunción del endotelio se piensa que también juega un rol en el desarrollo de la arteriosclerosis y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Louey y Thornburg, 2005). Efectos cardíacos de programación pueden ser inducidos por alteraciones en la dieta materna, la exposición fetal a niveles elevados de corticoides, hipoxia fetal crónica y la anemia, y el uso de la nicotina o la cocaína durante la gestación. Estos estímulos generan una variedad de cambios en la función cardíaca y en la expresión de genes, muchos de los cuales persisten en la edad adulta (Meyer y Lubo, 2007).

1.2 Mecanismos de Reprogramación Fetal

Los mecanismos involucrados en la RF se desconocen completamente, pero deberían dar cuenta de modificaciones genéticas estables, que permanezcan en el estado adulto, como son las modificaciones epigenéticas producidas por cambios en el patrón de metilación del ADN de ciertos genes, lo que ocurre tempranamente durante el desarrollo fetal (Kim, 2005). Estas modificaciones epigenéticas influyen en la expresión genética y generan patrones que se mantienen durante toda la vida y afectan al fenotipo sin alterar la secuencia de ADN (Suárez *et al.*, 2005). Se ha sugerido que este mecanismo estaría involucrado en la reprogramación fetal inducida por deficiencias nutricionales (Bogdarina *et al.*, 2004; Gallou-Kabani y Junien, 2005).

Datos experimentales en los roedores y las recientes observaciones en seres humanos sugieren que los cambios epigenéticos en los genes reguladores y los genes relacionados al crecimiento desempeñan un papel importante en la programación fetal. A nivel molecular, esto se refleja en cambios transcripcionales en las vías metabólicas y de crecimiento. Hay algunas pruebas de que algunos de estos cambios se logran por la alteración de la regulación epigenética de genes (Gicquel, 2008).

En la actualidad es generalmente aceptado que los fenómenos epigenéticos, tal como la metilación del ADN o bien modificaciones de la cromatina o ambos median la programación del desarrollo de células y tejidos. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de la traducción de un medio ambiente adverso materna en permanentes cambios epigenéticos son poco conocidos (De Ruiter *et al.*, 2008).

2. Cadmio

2.1 Exposición medio ambiental e ingreso al organismo

Un estímulo adverso de amplia distribución en el medio ambiente es el cadmio (Cd^{2+}), metal pesado distribuido ampliamente a nivel del medio ambiente moderno, principalmente como resultado de la polución proveniente de una gran variedad de fuentes (industria minera, baterías, pigmentos, plásticos) (Järup *et al.*, 1998; Järup 2003). La importancia del Cd^{2+} como un contaminante industrial y ambiental ha sido más aparente en los últimos años; actualmente se sitúa como séptimo en la lista de prioridad de sustancias peligrosas de la Organización de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (ATSDR, 200) (Prozialeck *et al.*, 2006).

Las principales amenazas para la salud humana de metales pesados están asociadas con la exposición al plomo, cadmio, mercurio y arsénico. Los metales pesados han sido utilizados por el hombre durante miles de años y han sido ampliamente estudiados por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, la exposición a metales pesados continúa, e incluso está aumentando en algunas partes del mundo, en particular en los países menos desarrollados, aunque las emisiones han disminuido en la mayoría de los países desarrollados durante los últimos 100 años (Järup, 2003).

El cadmio ingresa al ambiente mediante diversas fuentes tanto naturales como antropogénicas. Las fuentes naturales son la actividad volcánica y las rocas. Las fuentes antropogénicas están relacionadas con la manipulación y refinado del metal, así como por sus múltiples usos industriales en el proceso de fabricación de sustancias plásticas, vinílicas, fertilizantes, baterías de cadmio-níquel, semiconductores, estabilizadores, artículos escolares, tinturas y pigmentos utilizados en embalajes para alimentos. El Cd^{2+} no es biodegradable y sus usos tan diversos y su larga vida media permite su acumulación progresiva en el ambiente (Picoli *et al.*, 2003). El Cd^{2+} llega al suelo de los terrenos agrícolas por deposición aérea (41%), con los fertilizantes fosfatados (54%), por aplicación de abono de estiércol (5%) y por efluentes que contienen residuos líquidos y sólidos de plantas hidrometalúrgicas de cadmio. El tiempo de permanencia del cadmio en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse (Ramírez, 2002).

En humanos, la exposición aguda a niveles altos de cadmio ocurre ocasionalmente, por ejemplo, la exposición respiratoria de accidentes laborales o exposición oral aguda a dosis altas (Prozialeck *et al.*, 2006). En la exposición laboral industrial, el Cd^{2+} ingresa por inhalación de humos y vapores o por ingesta de los polvos de óxido de cadmio de sus compuestos. Los puestos de trabajo más agresivos en exposición laboral se hallan en la industria metalúrgica primaria de cadmio y de plomo-zinc, en la producción y uso de pigmentos de cadmio, en la producción de estabilizadores de plásticos con cadmio y en la fabricación de baterías de cadmio-níquel. En el hombre, los efectos por exposición a Cd^{2+} están bien documentados: es irritante y tóxico respiratorio, tóxico renal, causa cierto tipo de osteomalacia y se le ha asociado con cáncer (Ramírez, 2002).

Sin embargo, la principal exposición a cadmio implica típicamente la exposición crónica a niveles relativamente bajos de Cd^{2+} , que resulta de la aspiración (en el lugar de trabajo o por el humo de cigarrillo) o la ingestión (alimento o agua contaminada con Cd^{2+}) (Prozialeck *et al.*, 2006). El Cd^{2+} entra en la alimentación humana con los vegetales y productos animales. Se fija a las plantas más rápidamente que el plomo. Los frutos y semillas contienen menos Cd^{2+} que las hojas. El pescado, los crustáceos, el riñón e hígado de animales acumulan Cd^{2+} en grado relativamente elevado (Ramírez, 2002).

El Cd^{2+} tiene una vida media biológica muy larga en el cuerpo (15–30 años), la carga total del cuerpo aumentará gradualmente con el tiempo, con la acumulación en órganos específicos, tales como el hígado, el riñón y el corazón (Prozialeck *et al.*, 2006). Por su carácter acumulativo, es considerado uno de los elementos más peligrosos para la alimentación humana (Picoli *et al.*, 2003). Además, el Cd^{2+} es un metal pesado clasificado como un carcinógeno humano (Alonso *et al.*, 2007). En 1989, la Organización para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS), estableció la ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) de Cd^{2+} en el de $7 \mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / semana, correspondiente a $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / día, o $70 \mu\text{g} / \text{día}$ (OMS 1989) (Satarug y Moore, 2004).

En estudios de laboratorio, la DL_{50} oral para ratas es de 88mg/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 $0.005 \text{mg/Cd/Kg/día}$.

La principal fuente de exposición a Cd^{2+} no ocupacional, es a través del humo de tabaco, donde se encuentra en grandes cantidades (Henson y Chedrese, 2004). El tabaco contiene cantidades significantes de Cd^{2+} y el fumar es una de las fuentes principales de exposición al Cd^{2+} de la población en general (Prozialeck *et al.*, 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 Cd^{2+} desde el suelo (Soltis *et al.*, 2005). La cantidad de Cd^{2+} inhalado de cada paquete de 20 cigarrillos es aproximadamente 16 mg. El Cd^{2+} tiene un gran tiempo de eliminación, proporcionando la posibilidad para su acumulación en cantidades sustanciales durante el curso de la vida de un fumador (Kolluru *et al.*, 2006).

Se ha estimado que el cuerpo humano absorbe un 5% del Cd^{2+} ingerido en la dieta (alimento o agua contaminada con Cd^{2+}) y un 10% del Cd^{2+} inhalado (por el humo de cigarrillo o en el lugar de trabajo). Aproximadamente el 10% de la inhalación de óxido de Cd^{2+} se deposita en los tejidos del pulmón, y otro 30-40% se absorbe en la circulación sanguínea sistémica de los fumadores. Los fumadores tienen niveles 4-5 veces mayor de Cd^{2+} en la sangre y cantidades 2-3 veces mayores de Cd^{2+} en los riñones que los no fumadores (Satarug y Moore, 2004).

El Cd^{2+} , tras ser absorbido por vía pulmonar o gastrointestinal se transporta en la sangre unido a la albúmina y a los glóbulos rojos. En el hígado se induce la síntesis de metalotioneinas (MT) o proteínas de bajo peso molecular con efecto detoxificante sobre el metal (Sánchez *et al.*, 2006). El Cd^{2+} que está unido al metalotioneina (Cd^{2+} -MT) no está disponible para la recepción de la mayoría de los tejidos, aunque el complejo de Cd^{2+} -MT puede ser tomado por tejidos específicos tales como el epitelio del túbulo proximal donde puede contribuir a los efectos nefrotóxicos del Cd^{2+} . Consecuentemente, el Cd^{2+} también forma complejos de más baja afinidad con componentes del suero tales como albúmina, cisteína o glutatión. De esta forma se puede disociar y unir a otras moléculas de la superficie de la célula y, a veces, entrar en la célula (Prozialeck *et al.*, 2006).

Los genes de MT son inducibles por varios metales pesados tales como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu y Hg. Así, MT actúan como un mecanismo de defensa primaria en contra de la toxicidad de los metales pesados (Murata *et al.*, 1999). Aproximadamente el 50% del Cd^{2+} que se acumula en el organismo se localiza en el hígado y los riñones. Cuando se produzca la saturación de la MT, habrá cadmio libre que podrá ejercer su efecto tóxico (King *et al.*,

1999). El Cd^{2+} se acumula progresivamente en la placenta durante la gestación, actuando como mecanismo protector frente al transporte de Cd^{2+} hacia el feto. Al término de la gestación, la concentración de Cd^{2+} en la placenta es aproximadamente 10 veces más que en la sangre materna (Ronco *et al.*, 2005a). Por el contrario, la concentración de cadmio en el cordón umbilical es alrededor de 2 a 3 veces más baja que en la sangre materna. Por ello, se infiere que el Cd^{2+} puede interferir en la evolución de la gestación por acción directa sobre el metabolismo de la placenta, pero no por acción directa sobre el feto (Ramírez, 2002).

2.2 Efectos en el organismo de la exposición crónica a cadmio

El Cd^{2+} es un xenobiótico y, por tanto, un metal tóxico y no esencial para el organismo (Ramírez, 2002). La exposición al Cd^{2+} puede dar como resultado una variedad de efectos adversos en humanos y animales. Dependiendo de la dosis, ruta y duración de la exposición el Cd^{2+} puede dañar varios órganos como pulmón, hígado, riñón, huesos, testículos y placenta. Además, se ha demostrado que el Cd^{2+} tiene actividades teratogénicas y carcinogénicas (Prozialeck *et al.*, 2006).

Algunos de las controversias más significativas en el campo de toxicología del Cd^{2+} se han centrado en los efectos cancerígenos informados del Cd^{2+} . Los resultados de estudios en animales han mostrado que la exposición al Cd^{2+} puede llevar a la formación de sarcomas en el sitio de inyección, leucemia y cáncer de pulmón y próstata. Adicionalmente, los estudios epidemiológicos han sugerido una conexión entre la exposición del Cd^{2+} y cánceres humanos de pulmón, próstata y senos nasales, aunque otros estudios hayan mostrado sólo una conexión débil entre la exposición del Cd^{2+} y el cáncer. Basado en estas conclusiones, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado al Cd^{2+} como un carcinógeno humano (IARC, 1993) (Prozialeck *et al.*, 2006). La OMS (1993) clasificó como un agente que causa cáncer en los seres humanos, la exposición de Cd^{2+} por inhalación. El hábito de fumar cigarrillos proporciona una importante fuente adicional de Cd^{2+} , identificándolo como un factor de riesgo común en muchos cánceres humanos (Satarug y Moore, 2004). Sin embargo, los mecanismos fundamentales de los efectos cancerígenos del Cd^{2+} no han sido identificados. Además, hay evidencia que sugiere que bajo ciertas circunstancias el Cd^{2+} puede tener realmente

efectos anticancerígenos. La habilidad del Cd^{2+} para alterar la función de endotelial podría tener importantes implicaciones con respecto a los efectos cancerígenos y anticancerígenos del Cd^{2+} (Prozialeck *et al.*, 2006).

Con la exposición crónica a niveles bajos de Cd^{2+} , el riñón es uno de los sitios más importantes de la toxicidad del Cd^{2+} . Se afecta principalmente el túbulo proximal y las células vasculares de endotelio del riñón también pueden ser afectadas (Prozialeck *et al.*, 2006). El cadmio se concentra en el riñón, induce proteinuria y la disfunción renal. El calcio dietético puede mitigar la toxicidad del cadmio (Houston, 2007).

Los niveles de Cd^{2+} en órganos como el hígado y la corteza renal aumentan con la edad debido a la falta de un activo proceso bioquímico para su eliminación junto con la reabsorción renal. Aproximadamente 0,001% de Cd^{2+} en el cuerpo se excreta por día, principalmente en la orina (Satarug y Moore, 2004). Estudios sugieren, que la exposición en el útero de cadmio (0,5 mg.kg, de cloruro de cadmio) durante toda la gestación, conduce a efectos tóxicos renales en la descendencia adulta. Estos resultados sugieren que la contaminación de ratas gestantes es un grave peligro y es crítico para la función renal de su descendencia (Jacquillet *et al.*, 2007).

Bajo condiciones de exposición a niveles bajos de Cd^{2+} , el hígado generalmente no es dañado. En contraste, la exposición aguda a niveles más altos que a menudo son utilizados en estudios animales, el hígado acumula rápidamente niveles altos de Cd^{2+} y hay cambios en las células endoteliales vasculares hepáticas y son evidentes los signos de necrosis y/o apoptosis del parénquima varias horas después (Prozialeck *et al.*, 2006).

La exposición ambiental al Cd^{2+} disminuye la densidad ósea indirectamente a través de hipercalciuria como resultado de la disfunción tubular renal. En ausencia de disfunción tubular renal, la exposición ambiental al Cd^{2+} aumenta la resorción ósea en las mujeres, lo que sugiere un efecto directo osteotóxico con un aumento de calciuria y cambios reactivos en las hormonas calciotrópicas (Schutte *et al.*, 2008). Hallazgos han llevado a la hipótesis de que la prolongación de la pérdida urinaria de calcio causada por el Cd^{2+} es suficiente para promover la desmineralización ósea, que puede conducir a un incremento en la fragilidad ósea y el riesgo de fracturas (Satarug y Moore, 2004).

Con relación al aparato reproductivo, son varios los estudios realizados *in vivo* que relacionan al Cd^{2+} con procesos de sensibilidad embriogénica, necrosis gonadal, hipertrofia

y atresia de gametos (Rodríguez *et al.*, 2005). Ha sido demostrado, la incorporación de Cd^{2+} en la cromatina de los gametos en desarrollo y que el Cd^{2+} se acumula en los embriones de cuatro células en adelante, y una dosis más elevada inhibe la progresión a la fase de blastocisto. Tras la implantación, la exposición oral o parenteral de Cd^{2+} en animales de experimentación causa una amplia gama de anomalías en el embrión.

En el ovario el Cd^{2+} aumenta con la edad, y se ha asociado con la falta de progresión del desarrollo de los ovocitos, de primario a secundario y la falta de ovulación. En el testículo, se ha observado que los cambios se deben a la interrupción de la barrera hemato-testicular y al estrés oxidativo, con la aparición de la necrosis en exposición a una dosis más elevada (Thompson y Bannigan, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2007).

El Cd^{2+} es considerado un “disruptor endocrino” por tener acciones semejantes a estrógenos (Henson y Chedrese, 2004). Estudios han demostrado que funcionalmente, Cd^{2+} actúa como los estrógenos en células del cáncer de mama (Johnson *et al.*, 2003). Ha sido demostrado que el Cd^{2+} es un agonista de los receptores de estrógeno, y en un estudio fueron observados efectos parecidos al estrógeno en ratas ovariectomizadas expuestas a bajas concentraciones de Cd^{2+} (Ohrvik *et al.*, 2006).

El Cd^{2+} durante la etapa de gestación se concentra en la placenta, donde probablemente tendría un rol protector (Wier y Millar, 1987). Estudios han demostrado que en embarazadas, una consecuencia del hábito de fumar es el menor peso de nacimiento de sus hijos, hecho que se correlaciona positivamente con un aumento en la concentración placentaria de Cd^{2+} (Kuhnert *et al.*, 1987; Piasek *et al.*, 2001; Ronco *et al.*, 2005a). Los niveles elevados de Cd^{2+} placentarios modifican la homeostasis de iones bivalentes y probablemente, la función de proteínas en las que participan como cofactores (Ronco *et al.*, 2005b). Resultados indican que concentraciones elevadas de Cd^{2+} en placenta humana

afectan la homeostasis de Zn^{2+} y posiblemente su transporte al feto (Ronco *et al.*, 2005a, b, 2006), lo que ha sido demostrado recientemente en un modelo de roedor (Kuriwaki *et al.*, 2005). Estudios epidemiológicos en una cohorte de tres generaciones de madres fumadoras, en las cuales el ingreso de Cd^{2+} por el humo de tabaco y su acumulación en la placenta es significativamente mayor que en mujeres no fumadoras, demostraron que la exposición prenatal al humo de cigarro producía efectos en la descendencia que eran independientes de los propios efectos en la salud durante la infancia, apoyando así la hipótesis de una RF bajo exposición a humo de tabaco (Misra *et al.*, 2005).

2.3 Efectos en el sistema cardiovascular

La función del sistema vascular implica interacciones complejas entre el endotelio vascular, músculo liso, el sistema inmune, y el sistema nervioso. Los metales tóxicos cadmio, arsénico y plomo, pueden orientar su objetivo al sistema vascular en una variedad de formas, que van desde lesiones hemorrágicas a cambios metabólicos. La exposición crónica de Cd^{2+} se asocia con diversos trastornos cardiovasculares como la hipertensión y cardiomiopatía (Prozialeck *et al.*, 2008). Publicaciones recientes han demostrado que el Cd^{2+} está implicado en enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, hipertensión, ataque y falla cardíaca. Es muy común la acumulación del Cd^{2+} en las arterias de fumadores. La mayoría de los fumadores desarrollan enfermedades vasculares agudas, las cuáles se asocian a disfunciones endoteliales (Kolluru *et al.*, 2006). Los informes recientes, destacan la relación de la exposición a Cd^{2+} y las enfermedades vasculares, indicando que las células del endotelio vascular son el objetivo de toxicidad del Cd^{2+} . Sin embargo, los mecanismos subyacentes no han sido totalmente dilucidados (Dong *et al.*, 2009). El endotelio vascular consiste en células especializadas tipo epitelial que cubren la superficie del lumen de todos los vasos sanguíneos y forman las redes capilares que median la entrega de oxígeno y nutrientes a los tejidos del cuerpo. Además, participa en la regulación de la presión sanguínea, angiogénesis, aterosclerosis, inflamación, formación y metástasis del tumor (Prozialeck *et al.*, 2006). La sugerencia de que el endotelio vascular puede ser un objetivo importante de la toxicidad del Cd^{2+} provino de los estudios durante los años 1950 y 1960 que muestran que la exposición aguda a Cd^{2+} en muchos escrotos de mamíferos tuvo como resultado un edema y hemorragia en el testículo. Estudios

posteriores mostraron que el Cd^{2+} causó el quiebre de la unión entre las células del endotelio de los capilares y vénulas, lo que dio como resultado un incremento en la permeabilidad vascular, seguido de un edema, hemorragia y necrosis testicular. Estudios adicionales mostraron que alteraciones similares inducidas por Cd^{2+} sobre la integridad del endotelio podrían ocurrir también en otros tejidos incluyendo: el pulmón, útero, sistema nervioso, hígado y placenta (Prozialeck *et al.*, 2006).

El Cd^{2+} en el sistema cardiovascular, interviene en la síntesis o regeneración de los componentes de la matriz extracelular, especialmente los glicosaminoglicanos, y pueden actuar sobre la estructura y metabolismo del endotelio. Ese daño a la matriz subendotelial y células endoteliales en individuos expuestos a Cd^{2+} , podría ser responsable del desarrollo de las placas ateroscleróticas. Se ha encontrado que la exposición a largo plazo a dosis bajas de Cd^{2+} causa la hipertensión y la arteriosclerosis sin la disfunción renal en las ratas (Kolluru *et al.*, 2006).

En el proceso aterosclerótico uno de los primeros signos es la disfunción del endotelio. Hay muchos factores que provocan esta disfunción, y uno de ellos puede ser iones de metales pesados (Kuliczowski *et al.*, 2004). También se sabe que la inflamación es una de las vías en la aterosclerosis. Es posible que el Cd^{2+} pueda inducir una reacción inflamatoria en distintos órganos y en el sistema cardiovascular (Mlynek y Skoczynska, 2005). El Cd^{2+} puede causar la liberación de una variedad de mediadores proinflamatorios de las células endoteliales que facilitarían el proceso aterosclerótico. Además, el Cd^{2+} estimula la liberación de agentes antitrombóticos y facilita la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio. Promueve también la proliferación de células de músculo liso vascular y aumenta la producción de los componentes extracelulares de la matriz que aumentan la rigidez de los vasos sanguíneos. Finalmente, el Cd^{2+} puede inhibir la liberación y/o las acciones de las sustancias vasodilatadoras del endotelio-derivado tales como prostanoïdes, óxido nítrico, etc. y puede antagonizar las acciones vasoconstrictoras de la endotelina (Prozialeck *et al.*, 2006). Se sugiere además que el Cd^{2+} podría ser una causa irreconocida de cardiomiopatía dilatada (DCM), actuando sobre el endotelio vascular del corazón, ya que estudios demuestran que: 1) Cd^{2+} se puede acumular específicamente en el corazón de mamíferos; 2) los humanos con (DCM) han disminuido significativamente la vascularización de su corazón; 3) pacientes de DCM han elevado los niveles de Cd^{2+} en

su sangre y orina; y 4) pacientes de DCM tiene una menor expresión de VE-caderina y B-catenina en sus células vasculares del endotelio (Prozialeck *et al.*, 2006).

Estudios recientes, en donde las células del endotelio fueron expuestas a concentraciones bajas de Cd^{2+} , sugirieron totalmente que el Cd^{2+} actúa directamente en células del endotelio para inhibir angiogénesis, lo cual podría tener implicaciones importantes en el mecanismo de la cardiomiopatía y la inhibición del crecimiento de algunos tipos de cáncer (Prozialeck *et al.*, 2006). Resultados muestran que el Cd^{2+} puede interrumpir la adhesión célula-célula mediada por caderina, sugiriendo que podría inhibir la angiogénesis mediante la alteración de la función de la VE-caderina, molécula esencial para la angiogénesis. Estos efectos indican que el Cd^{2+} actúa directamente sobre las células en lugar de la matriz extracelular (Woods *et al.*, 2008).

Aunque el Cd^{2+} representa un problema de salud ambiental mayor, los mecanismos específicos por el cual produce su efecto adverso, aún tienen que ser explicados más profundamente. Los estudios han mostrado que el Cd^{2+} puede causar una variedad de efectos bioquímicos, metabólicos y citotóxicos (Prozialeck *et al.*, 2006). Los mecanismos bioquímicos propuestos se han centrado en la habilidad del Cd^{2+} para interferir con las acciones de metales como zinc (Zn^{2+}), selenio (Se) y cobre (Cu), interrumpir vías calcio-dependiente, desactivar los grupos de sulfidrilos e inducir estrés oxidativo (Prozialeck *et al.*, 2006). El Cd^{2+} tiene una alta afinidad por los grupos sulfidrilos (-SH), inactivando numerosas reacciones enzimáticas, aminoácidos y antioxidantes que contienen sulfuro, con la consiguiente disminución de la defensa oxidante y el aumento de estrés oxidativo (Houston, 2007).

3. Endotelio vascular y disfunción

Las células endoteliales tienen funciones metabólicas y sintéticas, participan en la regulación de la trombosis, trombolisis, adhesión plaquetaria, regulación del tono vascular y la circulación sanguínea. Las células endoteliales a través de la secreción de una gran variedad de mediadores, son capaces de influir en la función celular en todo el cuerpo. Una respuesta incontrolada de células endoteliales participa en los procesos de muchas enfermedades, incluyendo la aterosclerosis, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, sepsis y síndromes inflamatorios. Estas enfermedades están relacionadas con la lesión endotelial, activación y disfunción (Galley y Webster, 2004). Con el conocimiento de las funciones normales del endotelio, emergió el concepto de disfunción endotelial. Se define la disfunción endotelial como la situación en la que en presencia de un endotelio morfológicamente normal, éste no responde con una dilatación normal o completa ante el estímulo de sustancias como acetilcolina o bradikinina, que ejercen su efecto vasodilatador a través de la liberación de óxido nítrico (NO). Sin embargo, la arteria tiene una respuesta relajadora completa al estímulo con nitroglicerina (NTG), nitroprusiato sódico (NPS), o cualquier otro nitrovasodilatador. Pero más extensamente el concepto de disfunción endotelial se puede definir como la situación en que un endotelio morfológicamente normal presenta alteración de cualquiera de sus funciones (Berrazueta, 2004). La disfunción endotelial se piensa que es una de las principales causas de lesión vascular en los fumadores (Hu *et al.*, 2009).

3.1 Moléculas relacionadas con el daño endotelial: VCAM-1, 8-isoprostano, VEGF y HO-1.

Los estudios epidemiológicos han demostrado una fuerte asociación entre el tabaquismo y las enfermedades cardiovasculares. Diversas especies oxidativas y radicales libres se producen durante el tabaquismo y llevar a inflamación y disfunción endotelial (Chen *et al.*, 2009). La disfunción endotelial promueve la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), que va a favorecer el contacto entre los leucocitos circulantes y el endotelio (Bevilacqua, 1993). La expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-

1), E-selectina, y la adhesión de los leucocitos están presentes en la aterosclerosis (Chen *et al.*, 2009). La VCAM-1 aumenta su expresión en células endoteliales con daño crónico asociado a factores de riesgo de arteriosclerosis como tabaquismo, hipertensión e hipercolesterolemia (Rigla *et al.*, 2001). Se cree que VCAM-1 desempeñan un papel fundamental en el tránsito de leucocitos a los sitios de lesiones ateroscleróticas (Zibara *et al.*, 2000). La disfunción endotelial está especialmente relacionada con el reclutamiento de los leucocitos durante la formación de la lesión aterosclerótica. Otros autores han demostrado que VCAM-1 es expresada ampliamente sobre células endoteliales de arterias ocluidas durante la aterosclerosis acelerada (Macías *et al.*, 2003).

La disfunción endotelial y estrés oxidativo están implicados en la aterogénesis. VCAM-1, se ha determinado como marcador de disfunción endotelial y 8-isoprostano, como marcador de estrés oxidativo (Ruef *et al.*, 2006). Se ha establecido claramente que los radicales libres contribuyen a la disfunción endotelial y están involucrados en el envejecimiento y la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares, como es la aterosclerosis. La determinación de isoprostanos es actualmente el método más confiable para determinar el estrés oxidativo *in vivo*. En particular, el 8-isoprostano está considerado como un marcador de déficit de antioxidantes y de estrés oxidativo para evaluar patología vascular. Los hallazgos señalan que niveles elevados de 8-isoprostanos en el plasma están asociados con la extensión y la severidad de la enfermedad coronaria y con la aparición de diferentes factores de riesgo aterogénico (Vassale *et al.*, 2003). Los isoprostanos son una serie de compuestos semejante a prostaglandinas de origen no enzimático que se formada *in vivo* a través de la peroxidación del ácido araquidónico mediada por radicales libres. Datos clínicos y experimentales sugieren el rol de los isoprostanos en la aterogénesis; estos compuestos, una vez liberados de la membrana celular por fosfolipasas, puede inducir vasoconstricción, la agregación plaquetaria y la proliferación celular (Mannarino *et al.*, 2009). Los isoprostanos se pueden detectar en forma libre en fluidos biológicos o esterificados en lipoproteínas de baja densidad en tejidos o membranas. Pueden ser detectados en el momento del nacimiento en el cordón umbilical, donde su concentración aumenta en las madres que fuman cigarrillos. Los niveles elevados de isoprostanos en fluidos biológicos en condiciones patológicas como la aterosclerosis, la lesiones isquemia-reperfusión, y enfermedades inflamatorias vasculares, sugieren una relación entre la

peroxidación lipídica y esas enfermedades (Cracowski *et al.*, 2001). La correlación de las concentraciones y la gravedad de las enfermedades indican que estos compuestos pueden ser de interés como marcadores predictivos (Cracowski *et al.*, 2000).

La disfunción endotelial es un rasgo característico de los vasos ateroscleróticos, arterias sujetas a la lesión mecánica, y vasos colaterales que se desarrollan en respuesta a la isquemia severa. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor angiogénico producido por una variedad de células, incluidas las células endoteliales, con receptores específicos en el endotelio. Angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente) está mediada por VEGF. Además, VEGF contribuye a la respuesta inflamatoria a través de la estimulación de la liberación de moléculas de adhesión, metaloproteinasas y óxido nítrico, a través de la transcripción del factor activador de proteína-1 (AP-1) (Galley y Webster, 2004). VEGF es un importante mediador de neovascularización en condiciones fisiológicas y patológicas, juega un papel trascendental en el desarrollo y regulación de la angiogénesis del tejido inducida por hipoxia (Yoon *et al.*, 2005).

El cadmio tiene la capacidad de producir estrés oxidativo y de alterar la homeostasis de metales de zinc lo cual puede conducir a aumento de los mecanismos de defensa involucrando la inducción de la enzima antioxidante Heme oxigenasa-1 (HO-1) y de metaloproteínas en el riñón (Satarug *et al.*, 2006). El estrés oxidativo juega un importante rol en la fisiopatología de varias enfermedades vasculares y ha tomado una gran atención el rol protector de la HO-1 sobre la vasculatura contra la injuria inducida por oxidantes (Heo *et al.*, 2007). HO-1, es una enzima que degrada el grupo hemo a monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina, ha sido reconocida que juega un papel crucial en la defensa celular contra las condiciones de estrés, no sólo relacionados con la liberación de hemo (Loboda *et al.*, 2008). El exceso de hemo libre cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede dar lugar a disfunción células endoteliales, como se ha visto en numerosas patologías incluyendo la hipertensión y la diabetes, así como la lesión isquemia / reperusión (Abraham y Kappas, 2005). El contenido celular de hemo proviene de proteínas que contienen hemo tales como hemoglobina, mioglobina, citocromos, y enzimas tales como óxido nítrico sintetasa, catalasa, peroxidasa, etc, requiere un balance entre la síntesis del hemo y su degradación. Los daños producidos por el hemo poseen múltiples blancos

celulares incluyendo bicapa lipídica, mitocondria, citoesqueleto, núcleo, y varias enzimas intracelulares.

Han sido descritas dos isoformas de HO: una enzima inducible, HO-1, y una isoforma constitutiva HO-2. Ha sido descrita también una isoforma HO-3, aislada de cerebro de rata y posee 90% de homología con HO-2 (Hill- Kapturczak *et al.*, 2003). HO-1 protege las células endoteliales de la apoptosis, participan en la relajación de los vasos sanguíneos, regulación del tono vascular, atenúa la respuesta inflamatoria en la pared del vaso, y participa en la angiogénesis (Loboda *et al.*, 2008). Se ha puesto gran atención en el papel protector de HO-1, ya que ejerce efectos anti-inflamatorio, antiproliferativo, anti-apoptóticos y anti-oxidantes sobre la vasculatura. Los mecanismos precisos de protección de la HO-1 aún no se han entendido completamente, pero parece que implican los efectos protectores de los productos de la HO-1 (Chung *et al.*, 2008). La inducción de HO-1 conduce a la degradación de hemo prooxidante y a la producción de bilirrubina que es antioxidante. Además, el CO que se produce durante la degradación del hemo ha atraído mucho interés por su potencial función en la regulación del tono vascular (Wang *et al.*, 1998).

La HO-1 es inducida por CdCl₂, oxido nítrico y LDL oxidada. El mecanismo de inducción de HO-1 es complejo y es estrechamente regulado a nivel de la transcripción (Hill- Kapturczak *et al.*, 2003). La transcripción de un número de genes de mamíferos está activada por metales pesados, pero los mecanismos de regulación y señalización de la transcripción no se conocen bien (Koizumi *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el humo del tabaco es una potente fuente de oxidantes que conducen a estrés oxidativo, induciendo la expresión de proteínas HS (choque térmico) y HO-1 en monocitos humanos normales. El humo del tabaco contiene numerosas sustancias químicas incluyendo metales pesados (Cd²⁺) y es también una potente fuente de oxidantes. Aunque los mecanismos precisos por el cual las células perciben y responden al estrés medio ambiental con la activación de la transcripción de genes blancos apropiados, aún no es completamente entendido (Favatier y Polla, 2001). En consecuencia, un aumento en la inducción de HO-1 por Cd²⁺ puede ser un buen marcador de una reprogramación del fenotipo cardiovascular.

HIPÓTESIS

En un modelo de roedor, la exposición a Cd^{2+} durante la gestación induce en sus crías, reprogramación fetal cardiovascular, caracterizada por una disfunción endotelial mediada por una expresión alterada de genes específicos involucrados en la función endotelial.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la exposición a Cd^{2+} durante la gestación genera un ambiente intrauterino adverso lo que induce una reprogramación fetal del desarrollo cardiovascular que se caracteriza por una disfunción endotelial en la adultez.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Demostrar, en un modelo experimental de rata preñada, que la exposición a 30 ppm de Cd^{2+} en el agua de bebida durante todo el período de preñez produce un aumento en la concentración de Cd^{2+} en placenta y una disminución del peso al nacimiento de las crías.

2.- Demostrar que la exposición a Cd^{2+} durante la gestación altera la reactividad vascular en anillos aórticos de las crías (F1) en estado adulto (60 días).

3.- Demostrar que la exposición a Cd^{2+} durante la gestación induce una alteración de la expresión de la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) en anillos aórticos.

4.- Demostrar que la alteración de la reactividad vascular en las crías en estado adulto está asociada a un aumento de los niveles plasmáticos de 8-isoprostano y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

5.- Demostrar que los efectos anteriores se deben a un efecto indirecto de Cd^{2+} derivado de alteraciones funcionales a nivel placentario debido a su acumulación en este tejido, y no a una exposición directa del feto a través de la placenta o lactancia materna.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo de estudio

Se utilizó como modelo de estudio ratas de la cepa Wistar. Se seleccionaron ratas hembras vírgenes cuyo peso corporal se encontraba entre 200- 250 gramos. Las ratas se mantuvieron en el vivero del INTA con 12 h luz/12 h oscuridad a una temperatura de 22° C y humedad de 55%. Las ratas recibieron una dieta normal *ad libitum*, se utilizó alimento marca Champion para roedores (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis químico proximal del alimento.

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.)	522

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.

El manejo y tratamiento de los animales fue revisado y aprobado por el Comité de Ética Animal del INTA (Anexo 5).

2. Diseño Experimental

Se seleccionaron ratas hembras vírgenes de aproximadamente 60 días de edad (maduras sexualmente) que pesaron entre 200-250 gramos, para realizar las cruzas.

El período de estro, que corresponde al momento en que la hembra acepta al macho para la cópula, se puede evidenciar por medio de la visualización de células globosas y descamativas en el frotis vaginal. Las ratas se colocaron en jaulas en una relación de 2:3 (machos: hembras) durante todo el día y toda la noche. La monta se determinó en la mañana siguiente (9 AM) por medio de la visualización de espermatozoides en fluido vaginal al microscopio óptico. El lavado y aspirado vaginal se realizó con suero fisiológico a 37° C. Se tomó como monta positiva la visualización de al menos un espermatozoide al microscopio óptico. Las ratas cuya determinación de monta resulto positiva se colocaron en jaulas individuales, para iniciar los tratamientos.

Se establecieron 2 grupos de estudio, uno control y otro expuesto a Cd^{2+} , cada uno conformado por 8 ratas.

Grupo 1: ratas recién preñadas recibieron dieta normal *ad libitum* y agua destilada durante el período de gestación (21 días).

Grupo 2: ratas recién preñadas recibieron dieta normal *ad libitum* y fueron expuestas a Cd^{2+} en el agua de bebida durante la gestación (21 días).

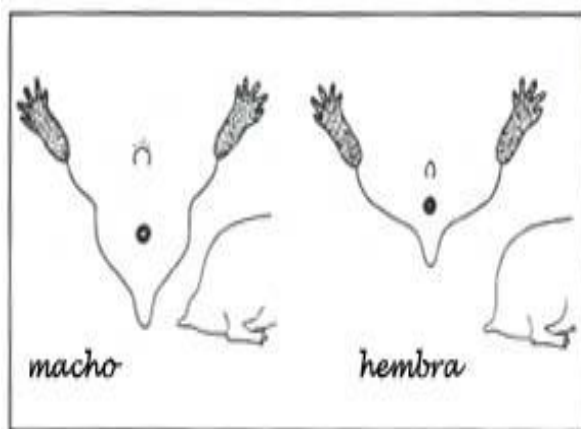
La exposición a Cd^{2+} se realizó vía oral, por medio del agua de bebida, como CdCl_2 que es soluble en agua, ya que por este medio es más fácil y preciso medir la ingesta de Cd^{2+} y los niveles de exposición.

Se eligió una dosis de 30 ppm de Cd^{2+} la cual fue establecida en un estudio piloto realizado previamente, con la cual se demostró que no había diferencias el número de crías y en el peso y talla de los animales. Durante este período de preñez (21 días), se controló al grupo 1 y 2 diariamente la ingesta de agua por medio de bebederos graduados y semanalmente se controló la ingesta de alimento y el peso de la madre. Después del parto los animales se mantuvieron con agua y dieta normal *ad libitum*.

A los 20 días de preñez se realizaron cesáreas a 4 ratas del Grupo 1 y a 4 ratas del Grupo 2. Todas las cesáreas se realizaron en la mañana (9:00-11:00 h) y se utilizó CO₂ para anestesarlas. Durante la cesárea fueron extraídas todas las placentas, las cuales se pesaron y almacenaron en nitrógeno líquido y luego a -80° C, para posteriormente liofilizar y determinar el contenido de cadmio. A las crías se les determinó su peso y talla y se almacenaron 2 fetos por cada rata en nitrógeno líquido y a -80° C para luego liofilizar y determinar el contenido de cadmio.

Las ratas restantes (4 del Grupo 1 y 4 del Grupo 2) se mantuvieron hasta el día del parto (día 21). En la mayoría de las ratas el parto se desarrolló durante la noche y madrugada. Las crías fueron pesadas 24 horas después del parto y se seleccionaron al azar 5 crías de cada sexo (Figura 1) por rata (total 10 crías por rata, 40 crías por grupo (20 machos y 20 hembras)).

Figura 1: Sexaje de las crías. En las hembras la distancia desde el ano y la apertura genital es menor que en los machos.



Los animales después del parto recibieron dieta y agua normal *ad limitum*. Las crías se mantuvieron con la madre hasta el destete (21 días) y se controló el peso de las crías semanalmente.

La lactancia de las ratas es de 21 días y el “peak” de la lactancia es el día 11- 13 después del parto (Rodgers, 1995). El día 11 de lactancia se tomaron muestras de leche materna de 5 ratas del grupo 2, expuestas a cadmio durante la gestación para determinar el contenido de cadmio de la leche. Para obtener estas muestras, las crías fueron separadas de

la madre durante toda la noche para favorecer la acumulación de la leche en la glándula mamaria. En la mañana siguiente se recolectaron las muestras de leche, las ratas fueron ordeñadas de forma manual. Esta técnica de ordeño requiere mucha paciencia y destreza manual; la rata se inmoviliza tomándola del pliegue de la piel correspondiente a la región del cuello y hombros en forma suave y con la otra mano se masajea y aprieta suavemente el pezón con el dedo pulgar y el dedo índice. De esta forma se obtienen pequeñas cantidades de leche de cada pezón que se fueron recolectando en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. El volumen final de leche que se obtuvo por rata fue aproximadamente 0,5 ml. Las muestras se almacenaron a -80° C para luego liofilizar y determinar el contenido de cadmio.

El destete se realizó a los 21 días, las ratas fueron marcadas apropiadamente y se separaron por sexo en jaulas con no más de 4 ratas por jaula. Se eligieron al azar 5 crías de distintas madres recién destetadas y se les tomó muestras de sangre y se extrajo el hígado, la aorta y los riñones; luego se almacenaron a -80° C para determinar el contenido de cadmio. El resto de las crías destetadas se mantuvieron con agua y dieta normal hasta llegar al estado adulto (60 días). En esa fecha se seleccionaron al azar 15 machos y 15 hembras de cada grupo. Se tomaron muestras de sangre y se sacrificaron por CO_2 y se les extrajo la aorta torácica. Para evitar que la sangre se hemolizara, ésta se extrajo suavemente y luego se vació la jeringa sin la aguja, descargando con cuidado y despacio la sangre en el tubo. La sangre fue recibida en tubos sin anticoagulante para obtener suero y en tubos con heparina al 10% para obtener el plasma. Para obtener el plasma, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos. Para obtener el suero, se dejó coagular la sangre algunas horas a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. El suero y plasma sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -80° C para su posterior análisis. El plasma se utilizó para medir los niveles de 8-isoprostano y el suero se utilizó para medir los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Esto se realizó por medio de Kit comerciales de Análisis Inmunoenzimático (EIA). Los resultados se expresaron en ng/ml.

La aorta torácica se extrajo mediante una incisión torácica media. Del segmento inmediatamente inferior del arco aórtico, se cortaron cuatro anillos de una longitud aproximada de 2 a 3 mm. A los anillos aórticos se les determinó la reactividad vascular.

Otro trozo de este tejido aórtico se almacenó en nitrógeno líquido y luego a -80° C para el análisis posterior del contenido de mRNA para la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), y también para determinar el contenido de cadmio.

Tabla 2: Cuadro resumen del diseño experimental.

GRUPO 1 (8 ratas)

GRUPO 2 (8 ratas)

PARTO 4 ratas	CESAREA 4 ratas	PARTO 4 ratas	CESAREA 4 ratas
5 ♀ y 5 ♂ por rata	Pesar las crías y las placentas	5 ♀ y 5 ♂ por rata	Pesar las crías y las placentas
Total 10 crías por rata Total 20 ♀ y 20 ♂ por grupo.	Medir cadmio en las placentas.	Total 10 crías por rata Total 20 ♀ y 20 ♂ por grupo.	Medir cadmio en las placentas
Día 11 de lactancia, obtención de leche para medir cadmio	Seleccionar 2 fetos por rata, 8 en total y medir cadmio.		Seleccionar 2 fetos por rata, 8 en total y medir cadmio.
Destete (21 días) y obtención de muestras de 5 crías al azar (sangre, hígado, aorta y riñones) para medir Cd ²⁺ .			
A los 60 días de edad se seleccionaron 15 ♀ y 15 ♂, se tomaron muestras de sangre para determinar niveles de 8-isoprostano y VEGF. Se extrajo la aorta para medir reactividad vascular, expresión HO-1 y VCAM-1 y para medir cadmio.		A los 60 días de edad se seleccionaron 15 ♀ y 15 ♂, se tomaron muestras de sangre para determinar niveles de 8-isoprostano y VEGF. Se extrajo la aorta para medir reactividad vascular, expresión HO-1 y VCAM-1 y para medir cadmio.	

3. Determinación de la concentración de cadmio

Se determinó la concentración de Cd^{2+} mediante el método de plasma acoplado inductivamente a un espectrómetro de masas (ICP-MS) en las siguientes muestras: placentas y fetos obtenidos en las cesáreas (20 días de gestación), leche materna obtenida el día 11 de la lactancia, sangre, hígado, aorta y riñones de ratas (F1) destetadas (21 días de edad) y aorta de rata (F1) adulta (60 días de edad).

Las muestras sólidas fueron previamente liofilizadas. Para ello se utilizó un liofilizador (SAVANT, Inglaterra) dejándolos toda la noche hasta obtención de una humedad menor que 1%. Luego todas las muestras fueron disueltas en medio $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, se les agregó un estándar interno de indio y se llevaron a un volumen final de 5-10 ml. Se determinó el elemento cadmio a través del método (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^{2+} utiliza para la determinación la masa de Cd^{111} 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.

4. Determinación de la reactividad vascular

Se determinó la respuesta vascular en los anillos aórticos de ratas adultas de 60 días de edad. Se seleccionaron 15 machos y 15 hembras de ambos grupos.

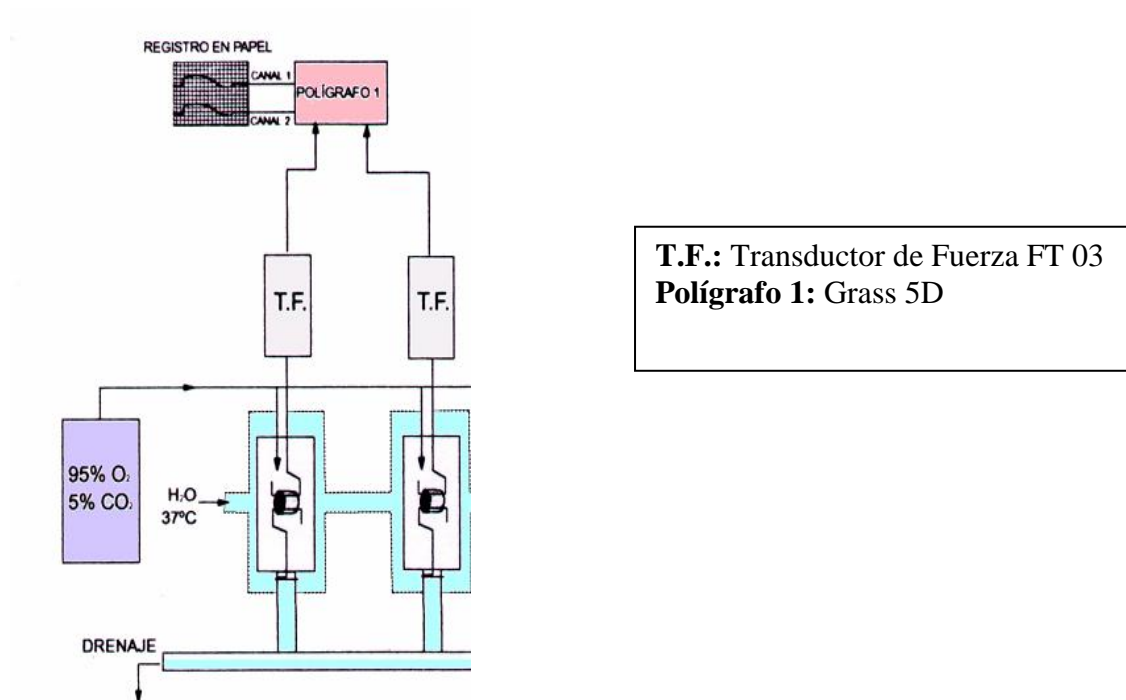
Las ratas fueron sacrificadas por CO_2 y mediante una incisión torácica media se les extrajo rápidamente la aorta torácica y se sumergió en una solución Krebs-Henseleit modificada (KHm), a 4°C y pH 7,4 (Anexo 1).

El tejido graso y conjuntivo circundante al segmento aórtico fue cuidadosamente eliminado, teniendo especial atención en no dañar el músculo liso vascular e intentando preservar en forma intacta su endotelio. Del segmento inmediatamente inferior al cayado aórtico, se cortó un anillo de una longitud aproximada de 2 a 3 mm. Dos ganchos de acero

inoxidable, atados cada uno a un hilo de seda de 15 cm. de longitud, fueron introducidos a través del lumen de cada anillo aórtico y éstos se colocaron en el interior de baños de vidrio de doble pared llenos con 10 ml de solución KHm, termorregulados a $37,0^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ mediante un baño de recirculación (Lauda Thermo-Temp) y constantemente burbujeados con CO_2 -bioxido (95% O_2 y 5% CO_2).

Los anillos aórticos se fijaron mediante el hilo de sus ganchos, uno al fondo del baño y el otro a un transductor de fuerza Grass FT-03, conectado a un polígrafo Grass (modelo 5D) para la determinación de la contracción isométrica (Figura 2). Los anillos aórticos fueron sometidos a una tensión basal de 1,5 g y se estabilizaron en solución KHm por un período de una hora (*estabilización*), cambiando la solución cada 10 minutos para evitar la acumulación de metabolitos.

Figura 2: Esquema del sistema utilizado para la determinación de la reactividad vascular. Montaje de los anillos aórticos y el registro de su contracción y relajación.



Después del período de estabilización los anillos fueron contraídos con potasio K^+ 70- 80 mM, hasta alcanzar una contracción estable y se relajo el tejido lavando con la solución KHm. Este procedimiento se repitió 1 vez más. Luego las arterias fueron contraídas con noradrenalina (NA) 10^{-7} M hasta alcanzar una contracción máxima estable, o de meseta. Una vez alcanzada la meseta de contracción inducida por NA, a los anillos aórticos se les agregó acetilcolina (ACh) en concentraciones crecientes, desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M. Así se realizó una curva dosis-respuesta acumulativa de relajación endotelio dependiente. Luego se lavaron los anillos aórticos con solución KHm y fueron contraídos con noradrenalina 10^{-7} M hasta alcanzar una contracción máxima estable y se les agregó a los anillos aórticos, concentraciones crecientes de nitroprusiato de sodio (NPS) desde 10^{-8} hasta 10^{-6} M. Se realizó una curva dosis-respuesta acumulativa de relajación endotelio independiente.

Al final del experimento, los anillos fueron pesados y la tensión desarrollada en las diferentes fases se normalizó expresándola en mg de tensión/mg de peso. Además, se normalizó la relajación expresando la tensión como porcentaje de relajación respecto de la contracción máxima inducida por noradrenalina, estandarizando al peso seco de la aorta ensayada.

Tabla 3: Cuadro resumen del protocolo de reactividad vascular.

Tensión de reposo 1,5 grs. (1,5 cm.), 60 minutos de estabilización.
1° Potasio K^+ 70-80 mM (depolarizante). Lavar hasta punto base.
2° Potasio K^+ 70-80 mM (depolarizante). Lavar hasta punto base.
3° Noradrenalina 1 μ l (10^{-7} M). Sin lavar.
4° Acetilcolina 1 μ l dosis de 10^{-8} M hasta 10^{-4} M. Lavar.
5° Noradrenalina 1 μ l (10^{-7} M). Sin lavar.
6° Nitroprusiato de sodio 1 μ l dosis de 10^{-8} M hasta 10^{-6} M. Lavar.
Pesar las aortas.

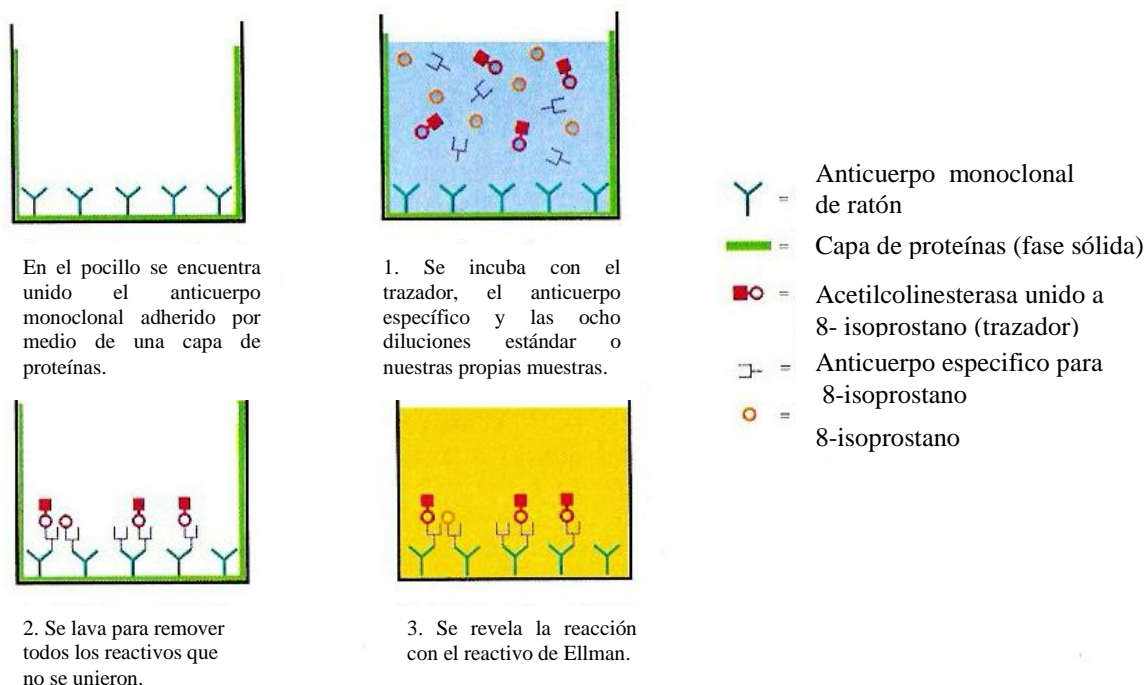
5. Determinación de la concentración de 8- isoprostano

Se determinó la concentración de 8-isoprostano en plasma de ratas adultas F1 de 60 días de edad, seleccionando 6 machos y 6 hembras de cada grupo (control y tratados con Cd^{2+} durante la gestación)

El 8-isoprostano del plasma (libre y esterificado) fue determinado utilizando un Análisis Inmuno-enzimático (EIA) comercial (Cayman Chemical). El ensayo se basa en la competencia entre el 8-isoprostano y un 8-isoprostano trazador que es el 8-isoprostano acetilcolinesterasa conjugado. Estos compiten por un número limitado de sitios de unión específica de antisuero de conejo 8-isoprostano específico. Ya que la concentración del 8-isoprostano trazador es constante mientras que la concentración del 8-isoprostano de la muestra varía, la cantidad del 8-isoprostano trazador que es capaz de unirse a los antisueros de conejo será inversamente proporcional a la concentración del 8-isoprostano en los pocillos. Este antisuero 8-isoprostano de conejo une anticuerpos monoclonales de ratón IgG, que han sido previamente colocados en los pocillos. La placa se lava para remover cualquier reactivo no unido y entonces se agrega el reactivo de Ellman's. (el cual contiene el sustrato para el 8-isoprostano trazador). El producto de esta reacción enzimática es un color amarillo que absorbe a 412 nm. La intensidad de este color se determina espectrofotométricamente y será proporcional a la cantidad de 8-isoprostano trazador unido a los pocillos, lo cual es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano de la muestra presente en los pocillos durante la incubación.

$$\text{Absorbancia} \propto (\text{unión 8-isoprostano trazador}) \propto 1/(\text{8-isoprostano})$$

Figura 3: Esquema del fundamento del Análisis Inmuno-enzimático (EIA) utilizado para la determinación de 8-isoprostano.



Previo a realizar el Análisis Inmuno-enzimático (EIA) comercial, se realizó la purificación de las muestras de plasma y se preparó la curva estándar a partir de un estándar de concentración conocida de 8-isoprostano, obteniendo así 8 diluciones que contienen distintas concentración de 8-isoprostano, en un rango de 0,8 pg/ml – 500 pg/ml (Anexo 2).

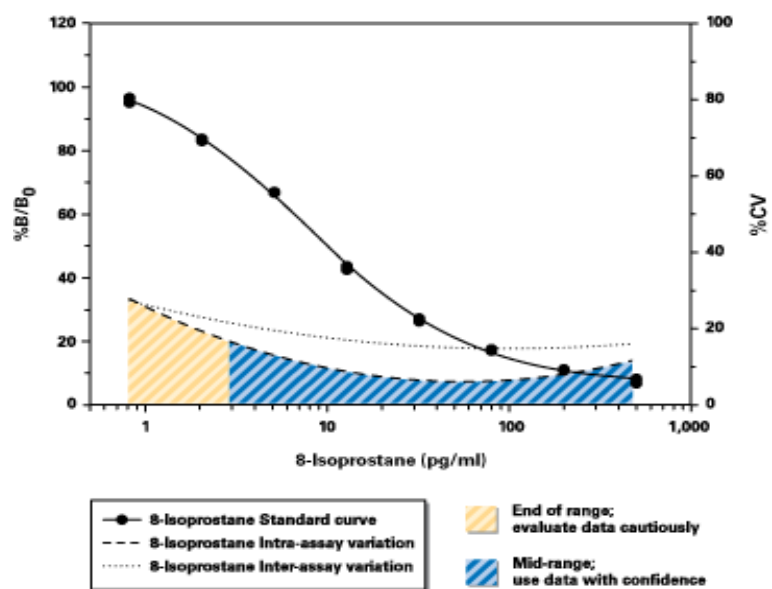
La placa del “Kit” esta formada por 96 pocillos y fue realiza en duplicado. Se seleccionaron 2 pocillos para el blanco (Blk), dos para NSB (unión no especifica), dos pocillos para B0 (máxima unión), dos pocillos para cada uno de los ocho puntos de la curva estándar y dos pocillos para cada muestra (24 muestras).

Este ensayo se desarrolló en 90-120 minutos. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (ELX800) a una longitud de onda de 405 nm.

Con las absorbancias obtenidas se calculó %B/B₀ el cual se extrapoló en la curva de calibración (Gráfico 1) y de este modo se obtuvo la concentración de 8-isoprostano en pg/ml.

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

Gráfico 1: Curva estándar del “kit” EIA 8-isoprostano.



6. Determinación de la concentración del Factor de crecimiento endotelial vascular

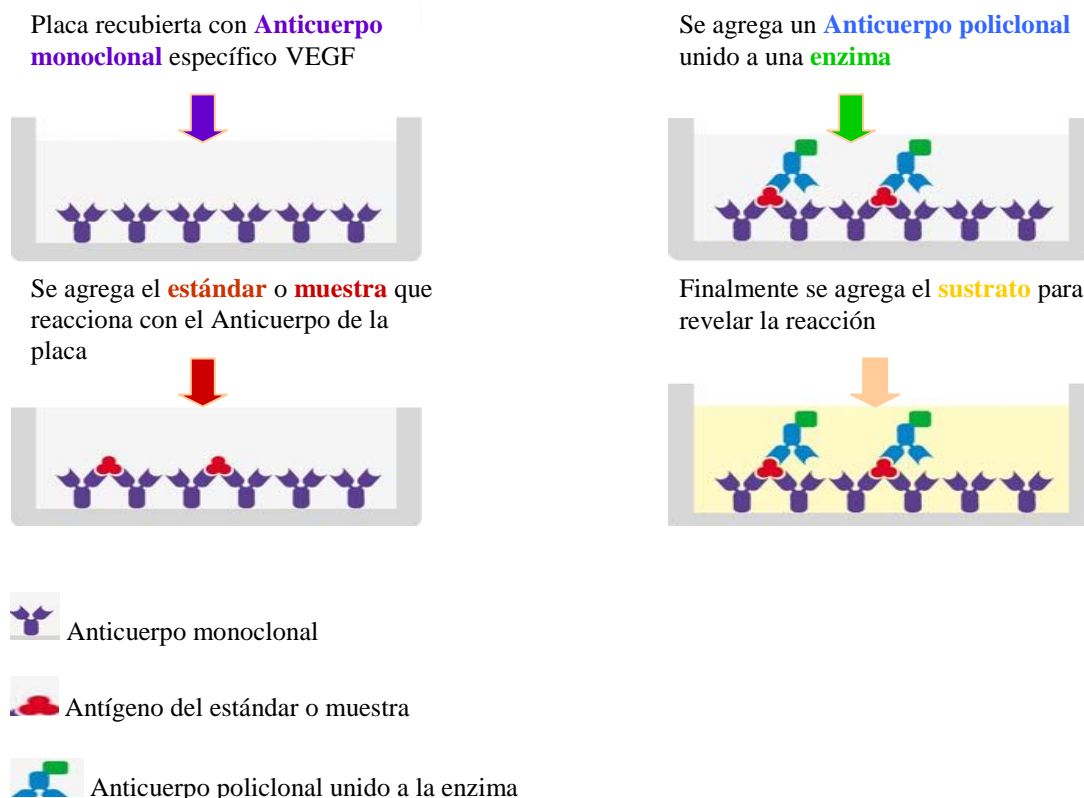
Se determinó la concentración del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en suero de ratas adultas F1 de 60 días de edad, seleccionando 6 machos y 6 hembras de cada grupo (control y tratados con Cd^{2+} durante la gestación). Para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de VEGF se utilizó la técnica de Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en “sándwich” (Quantikine® Inmunoensayo VEGF de Rata, de la firma R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA).

La técnica consiste en una reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno- anticuerpo entre VEGF y un anticuerpo específico contra VEGF. Los pocillos de la placa están revestidos con un anticuerpo monoclonal específico contra VEGF. Los estándares y las muestras de suero en estudio se agregan en los pocillos de la placa recubiertos con el anticuerpo, así cualquier VEGF presente en el suero es inmovilizado en el pocillo. Después se lavan los pocillos para eliminar cualquier sustancia que no haya sido fijada por el anticuerpo monoclonal y se añade un anticuerpo policlonal unido a una enzima. Se vuelve a lavar y se añade una solución sustrato a los pocillos.

De la reacción enzimática se obtiene un producto azul que se vuelve amarillo cuando se añade la solución “Stop”. La intensidad del color se mide en proporción a la cantidad de VEGF que haya quedado fijada en el pocillo en el primer paso.

Se determinó la densidad óptica de la placa utilizando un espectrofotómetro (ELX800) a 405 nm de longitud de onda. La concentración de VEGF en las muestras se determinó comparando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar.

Figura 4: Esquema del fundamento del método ELISA "Sándwich" utilizado para la determinación de VEGF.

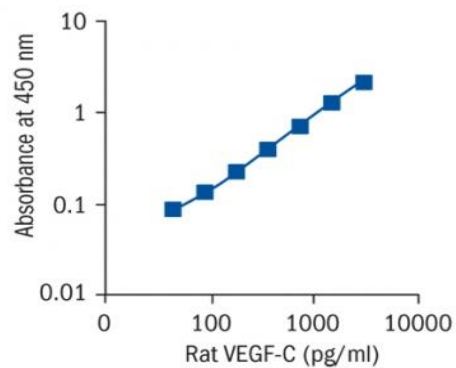


Previo a realizar el “kit” ELISA, las muestras de suero almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo y se prepararon los reactivos según las indicaciones del “kit”. Luego se preparó la curva estándar a partir de un estándar de concentración conocida de VEGF, obteniendo así 6 diluciones que contienen distintas concentración de VEGF, en un rango de $31,2\text{ pg/ml} - 2000\text{ pg/ml}$.

Todas las muestras, el control, y la curva estándar se realizaron en duplicado. La placa esta formada por 96 pocillos, se seleccionaron dos pocillos para el blanco, dos para el control, dos para cada uno de los siete puntos de la curva estándar y 2 pocillos para cada muestra (24 muestras). Luego de realizar el ensayo (Anexo 3), se determinó la densidad óptica de la placa utilizando un espectrofotómetro (ELX800) a una longitud de onda de 450 y 570 nm. Con las absorbancias obtenidas a 450 nm se le restó la lectura a 570 nm para corregir las imperfecciones de la placa (lecturas hechas directamente a 450 nm sin corrección puede ser imprecisas). A cada valor corregido se le restó el blanco y se sacó un promedio de los

duplicados, para cada estándar, control y muestra. Con los valores de los puntos de la curva estándar se confeccionó la curva y los valores de las muestras se extrapolaron en la curva estándar y de este modo se obtuvo la concentración de VEGF en pg/ml.

Gráfico 2: Curva estándar del “kit” ELISA VEGF.



7. Determinación y cuantificación del mRNA del gen de la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1):

Técnica Real Time RT-PCR

Utilizando la técnica transcripción reversa (RT) seguida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, se cuantificó el mRNA de HO-1 y VCAM-1, en tejido aórtico de ratas adultas F1 de 60 días de edad. Se seleccionaron 15 machos y 15 hembras de cada grupo (control y tratados con Cd²⁺ durante la gestación).

Transcripción reversa (RT), seguida por reacción en cadena de polimerasa (PCR) permite cuantificar la cantidad de mRNA presentes en la muestra original e identificar muestras de cDNA específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés *melting temperature*). Esta técnica cuantifica, la cantidad de ADN o ARN amplificado en cada momento mediante el marcaje con fluorocromos, y detectando la fluorescencia emitida cuando se genera el fragmento específico durante la amplificación. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto formado en cada ciclo de PCR. El método de cuantificación que se usó se basa en la cuantificación relativa de un gen problema (HO-1, VCAM-1) respecto a un gen de referencia, que es un gen endógeno no regulado o también llamado gen estructural, que se expresa en un nivel constante y moderadamente abundante. Se escogió como gen de referencia el gen que codifica para la β -actina, la cual es una proteína del citoesqueleto que se expresa en la mayoría de los tipos celulares.

El PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante el aparato *LightCycle 1,5* (Roche), y se utilizó el “kit” Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche. En esta técnica se utilizó: un molde DNA, partidores o primer específicos (Tabla 4), directo (*forward*) e inverso (*reverse*), desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), un tampón o buffer de reacción adecuado, iones Mg²⁺ y una DNA polimerasa termoestable. A esta mezcla se le adicionó una sustancia marcada con un fluorocromo (SYBR Green), que se une al DNA produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para Real Time PCR. La señal de fluorescencia corresponde a un incremento en el producto amplificado el cual es visualizado y medido en la pantalla del computador; y el software adecuado estima de

forma cuantitativa inmediatamente la señal fluorescente emitida. El riesgo de contaminación cruzada es bajo y los resultados son obtenidos en poco tiempo (30 min.).

El análisis de datos y seguimiento de los resultados para cada uno de los genes, se facilitó por el empleo del software LightCycler, versión 3.5 (Roche). La cantidad inicial de HO-1, VCAM-1 y β -actina en cada muestra se calculó a partir de la curva estándar, utilizando el valor predeterminado (cálculo /punto adecuado) y normalizando los valores de la β -actina.

Tabla 4: Partidores (sentido/ antisentido) del gen β -actina, HO-1 y VCAM-1, temperatura de fusión (Tm) y número de pares de bases del producto.

Gen	Sentido (<i>forward</i>) / Antisentido (<i>reverse</i>)	GenBank (gi)	Tm	Producto de PCR (pb)
β -actina	5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCA-3' / 5'-AAGAAAGGGTGTAACGCA-3'	42475962	(58)	352
HO-1	5'-CCAGCATATACCCGCTACCT-3' / 5'-TCTGTCACCCTGTGCTTGAC-3'	61098187	(62)	209
VCAM-1	5'-TGCCAGCGAGGGTCTACCA-3' / 5'-CTCAACACCCACAGGGCTCA-3'	6981699	(63)	391

Esta técnica se realizó en varias etapas (Anexo 4):

1. Extracción de RNA del tejido aórtico por el método de "TRI Reagent" (trizol).
2. Determinación de la concentración del RNA por espectrofotometría a 260 nm.
3. Determinación de la integridad del RNA mediante electroforesis.
4. El RNA fue tratado con DNAsa RQ1 libre de RNAsas (Promega), para eliminar los fragmentos residuales de DNA.
5. Síntesis del DNA complementario (cDNA) mediante transcripción reversa.
6. Amplificación y cuantificación del cDNA mediante PCR en tiempo real.

8. Análisis estadístico

Para definir la normalidad de los datos se utilizó 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 comparar diferencias. Las variables paramétricas fueron: el peso de las madres, el consumo de alimento de las madres, la expresión cuantitativa de mRNA de la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1).

En las variables que no presentaron una distribución normal (no paramétricas) se utilizó el test Kruskal-Wallis para ver diferencias entre grupos independientes. Las variables no paramétricas fueron: el consumo de agua de las madres, el peso corporal y talla de las crías, el peso de las placentas y la reactividad vascular (relajación endotelio-dependiente y relajación endotelio- independiente).

RESULTADOS

1. Evaluación de algunos parámetros de las madres durante la gestación.

Se evaluó el peso y el consumo de alimento y de agua en cada una de las madres del grupo control y del grupo expuesto a cadmio (Tabla 5), desde el momento de la cruce hasta la cesárea y parto. Durante este período no hubo diferencia en sus pesos ni en el consumo de alimento. La diferencia significativa que se presentó entre los grupos de estudio fue en el consumo de agua durante el tratamiento, siendo este mucho menor en el grupo expuesto a Cd^{2+} .

Tabla 5: Peso corporal y consumo de agua y alimento de las madres del grupo control y del grupo tratado con Cd^{2+} , desde el momento de la cruce hasta la cesárea y parto.

	Grupo control	Grupo tratado Cd^{2+}
n	7	9
*Peso madre al cruce (g)	223,7± 5	230,5± 5
*Peso madre al término (g)	390,6± 8	360,1± 6
Consumo de agua/día (ml)	40,3± 7 ^a	27,5± 6 ^b
Consumo de Cd^{2+} /día (mg.)	0	0,84± 0,20
Consumo total de Cd^{2+} durante la preñez (mg.)	0	16,88± 4,10
Consumo de alimento (g/ semana)	149,2 ± 4	139 ± 4

Resultados expresados ± desviación estándar.

*Peso de madres se expresa ± el error estándar.

a, b indican diferencias estadísticamente significativas, $p = 0.000001$.

2. Evaluación de algunos parámetros de las crías

Se evaluó en los fetos durante la cesárea los siguientes parámetros corporales: talla, y peso corporal, además del peso de las placentas. No se encontró diferencia entre los grupos en los parámetros estudiados ($p > 0,05$).

Tabla 6: Numero de crías, peso corporal de las crías, talla de las crías y peso de las placentas del grupo control y del grupo tratado con Cd^{2+} .

	Nº de crías	Peso (g)	Talla (cms)	Peso placentas (g)
Grupo control (n=83)	15 ± 2,31	3,57 ± 0,33	3,53 ± 0,17	0,52 ± 0,08
Grupo tratado Cd^{2+} (n=109)	14,3 ± 2,1	3,52 ± 0,24	3,50 ± 0,16	0,55 ± 0,08

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar (DS).

3. Determinación de la concentración de cadmio

Se analizaron 5 placentas y 6 fetos obtenidos en las cesáreas (20 días de gestación). En las placentas la concentración de cadmio detectada fue de $1,12 \pm 0,24$ ($\mu\text{g/g}$ peso seco). En las muestras de fetos no se detectó cadmio, siendo el límite de detección (LD) para este tipo de muestra 30 ng/mL, lo que indica que el cadmio no atravesó la barrera placentaria.

En las muestras de leche materna obtenidas el día 11 de lactancia y en los órganos (hígado, aorta y riñones) y en la sangre de las crías de 21 días de edad no se detectó cadmio, lo que sugiere que durante la lactancia el cadmio no pasa a las crías a través de la leche materna.

En las muestras de aorta de las crías adultas (60 días de edad) tampoco se detectó cadmio.

El límite de detección para las muestras líquidas fue de < 15 ng/mL y para las muestras secas de < 30 ng/mL).

Tabla 7. Concentración de cadmio

Muestra	Concentración Cd²⁺
*Placenta (µg/g peso seco) (n = 5)	1,12 ± 0,24
*Fetos (n =6)	< LD
**Leche materna (n =5)	< LD
**Sangre (21 días) (n =2)	< LD
*Hígado (21 días) (n =4)	< LD
*Riñón (21 días) (n =4)	< LD
*Aorta (21 días) (n =2)	< LD
*Aorta (60 días) (n =2)	< LD

* LD (< 30 ng/mL)

** LD (< 15ng/mL)

Resultados ± desviación estándar.

4. Determinación de la reactividad vascular

4.1. Curva de relajación inducida por acetilcolina (endotelio-dependiente)

Las arterias de ratas macho y hembra del grupo control y cadmio fueron contraídas con noradrenalina (NA) 10^{-7} M hasta alcanzar una contracción máxima estable, o de meseta y luego se les agregó concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh), desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M. Así se obtuvo una curva dosis-respuesta acumulativa de relajación endotelio dependiente (Tabla 8).

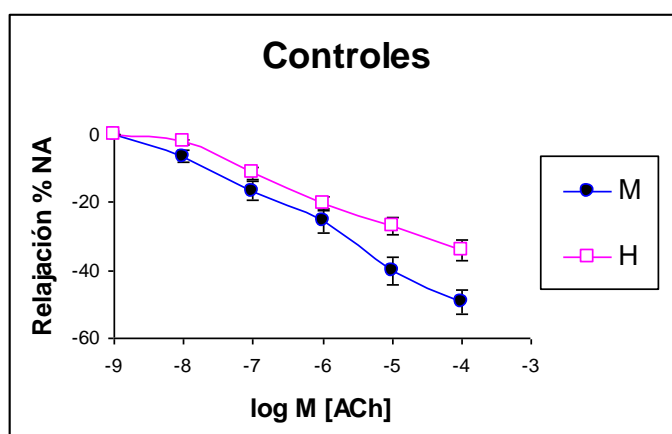
Tabla 8. Curva de relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina.

ACh [M]	Control Machos ^a (n = 15)	Control Hembras ^b (n = 15)	Cadmio Machos ^c (n = 15)	Cadmio Hembras ^d (n = 15)
10 ⁻⁸	6,38 ± 1,83	2,28 ± 0,74	2,96 ± 1,31	0,96 ± 0,4
10 ⁻⁷	16,66 ± 2,83	11,23 ± 1,34	10,96 ± 1,56	6,26 ± 1,32
10 ⁻⁶	25,30 ± 3,62	20,32 ± 1,93	18,23 ± 2,56	12,39 ± 2,09
10 ⁻⁵	40,12 ± 3,87	26,88 ± 2,19	25,21 ± 3,36	17,01 ± 2,35
10 ⁻⁴	49,24 ± 3,56	34,27 ± 2,74	27,96 ± 3,44	22,89 ± 2,73

Relajación expresada como % de la máxima contracción por NA (10⁻⁷ M).
 Resultados corresponden al promedio de la relajación (%) ± el error estándar.
 a- b $p < 0.012$, c- d $p < 0.025$, a- c $p < 0.002$, b- d $p < 0.001$

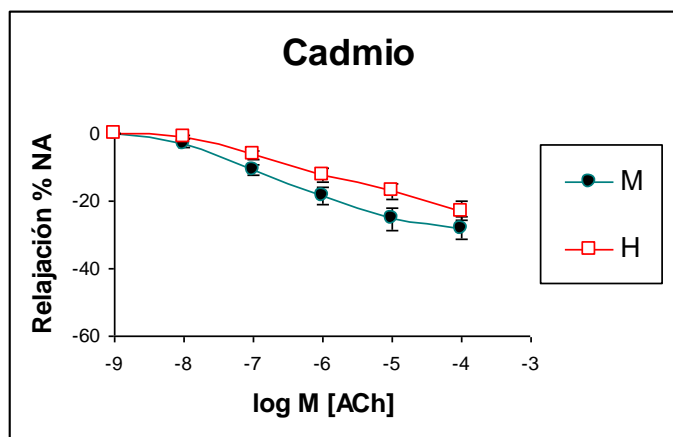
Dentro del grupo control, se apreciaron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo mayor la relajación de los anillos aórticos de los machos. El máximo de relajación promedio observado en machos fue de 49,24 ± 3,56 % y en hembras fue de 34,27 ± 2,74 %. (Gráfico 3)

Gráfico 3: Relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de ratas adultas del grupo control. (M) machos y (H) hembras. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10⁻⁷ M.



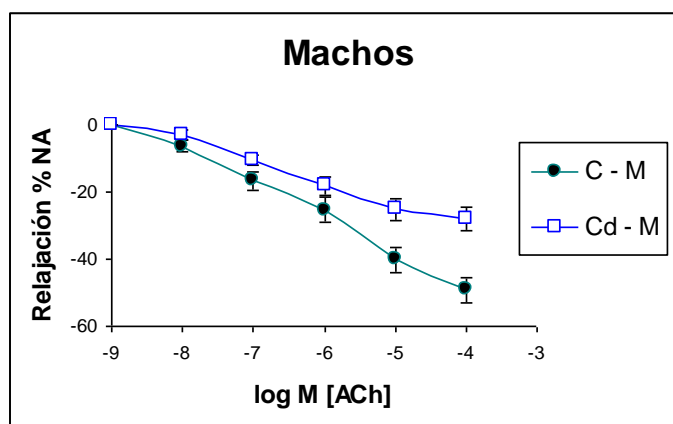
Dentro del grupo cadmio, se apreciaron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo mayor la relajación de los anillos aórticos de los machos. El máximo de relajación promedio observado en machos fue de $27,96 \pm 3,44$ % y en hembras fue de $22,89 \pm 2,73$ %. (Gráfico 4)

Gráfico 4: Relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de ratas adultas del grupo cadmio. (M) machos y (H) hembras. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.



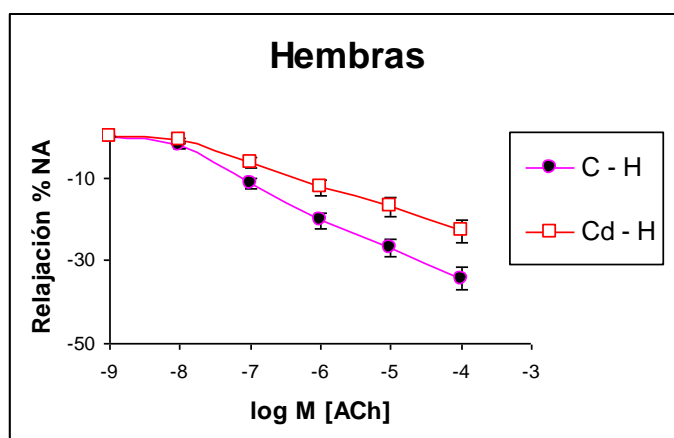
También se observaron diferencias significativas entre la relajación de los machos del grupo control y los machos del grupo cadmio, siendo mayor la relajación de los machos del grupo control (Gráfico 5).

Gráfico 5: Relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de ratas adultas macho del grupo control y cadmio. (C-M) control macho, (Cd-M) cadmio macho. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.



En las hembras de ambos grupos también se observaron diferencias significativas, siendo mayor la relajación de las hembras del grupo control que de las hembras del grupo cadmio (Gráfico 6).

Gráfico 6: Relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de ratas adultas hembra del grupo control y cadmio. (C-H) control hembra, (Cd-H) cadmio hembra. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.



4.2. Curva de relajación inducida por nitroprusiato de sodio (endotelio-independiente)

Los anillos aórticos de ratas macho y hembra del grupo control y cadmio fueron contraídos con noradrenalina 10^{-7} M hasta alcanzar una contracción máxima estable y luego se les agregó concentraciones crecientes de nitroprusiato de sodio (NPS) desde 10^{-8} hasta 10^{-6} M. Se realizó una curva dosis-respuesta acumulativa de relajación endotelio independiente (Tabla 9).

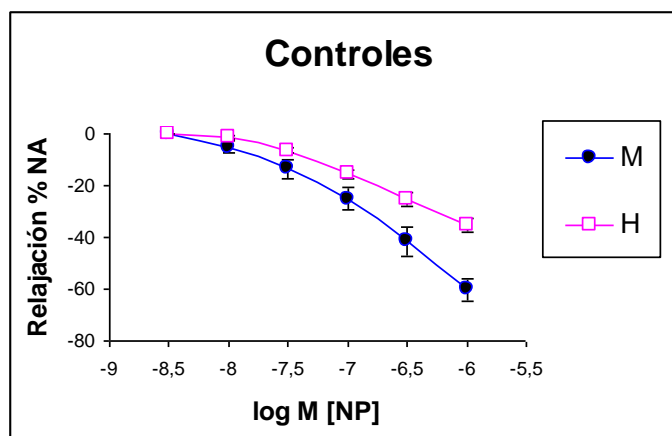
Tabla 9. Curva de relajación endotelio- independiente inducida por nitroprusiato de sodio

NPS [M]	Control Machos ^a (n = 15)	Control Hembras ^b (n = 15)	Cadmio Machos ^c (n = 15)	Cadmio Hembras ^d (n = 15)
10 ⁻⁸	5,11 ± 2,34	1,5 ± 0,55	4,40 ± 0,80	1,59 ± 0,64
10 ^{-7,5}	13,5 ± 3,73	6,46 ± 0,98	12,56 ± 1,79	6,23 ± 1,36
10 ⁻⁷	25,04 ± 4,61	15,35 ± 1,65	21,04 ± 2,05	12,57 ± 1,94
10 ^{-6,5}	41,52 ± 5,78	25,15 ± 2,62	28,73 ± 2,65	20,77 ± 2,89
10 ⁻⁶	60,11 ± 4,36	35,41 ± 2,86	34,64 ± 3,10	28,94 ± 4,37

Relajación expresada como % de la máxima contracción por NA (10⁻⁷ M).
Resultados corresponden al promedio de la relajación (%) ± el error estándar.
a-b $p < 0.024$, c-d $p < 0.002$

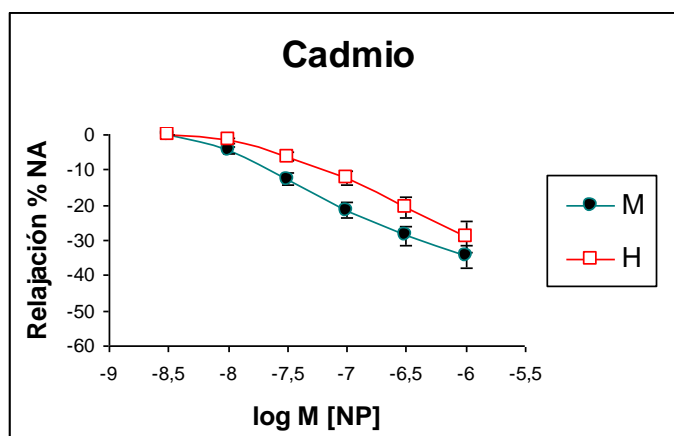
Dentro del grupo control, se apreciaron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo mayor la relajación de los anillos aórticos de los machos. El máximo de relajación promedio observado en machos fue de 60,11 ± 4,36 % y en hembras fue de 35,41 ± 2,86 % (Gráfico 7).

Gráfico 7: Relajación inducida por nitroprusiato en anillos aórticos de ratas adultas del grupo control. (M) machos y (H) hembras. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10⁻⁷ M.



Dentro del grupo cadmio, se apreciaron diferencias significativas entre machos y hembras, siendo mayor la relajación de los anillos aórticos de los machos. El máximo de relajación promedio observado en machos fue de $34,64 \pm 3,10$ % y en hembras fue de $28,94 \pm 4,37$ %. (Gráfico 8).

Gráfico 8: Relajación inducida por nitroprusiato en anillos aórticos de ratas adultas del grupo cadmio. (M) machos y (H) hembras. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.



No se observaron diferencias significativas entre los machos del grupo control y los machos del grupo cadmio (Gráfico 9) y entre las hembras del grupo control y las hembras del grupo cadmio (Gráfico 10).

Gráfico 9: Relajación inducida por nitroprusiato en anillos aórticos de ratas adultas macho del grupo control y cadmio. (C-M) control macho, (Cd-M) cadmio macho. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.

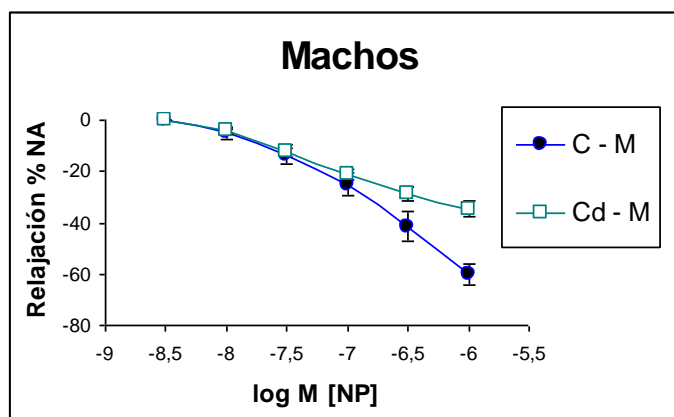
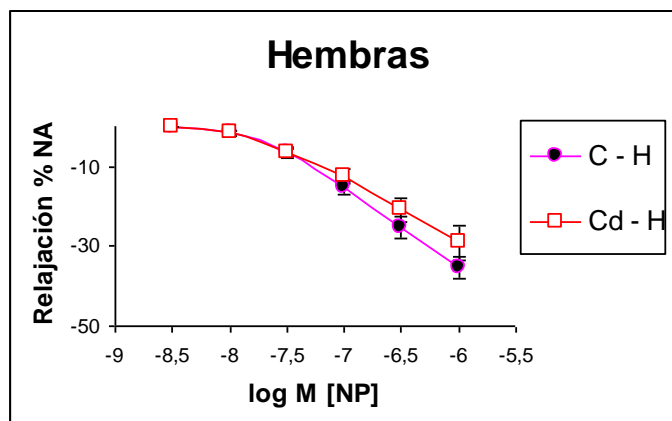


Gráfico 10: Relajación inducida por nitroprusiato en anillos aórticos de ratas adultas hembra del grupo control y cadmio. (C-H) control hembra, (Cd-H) cadmio hembra. La relajación se expresa como % de la máxima contracción inducida por noradrenalina 10^{-7} M.



5. Determinación de la concentración de 8- isoprostano

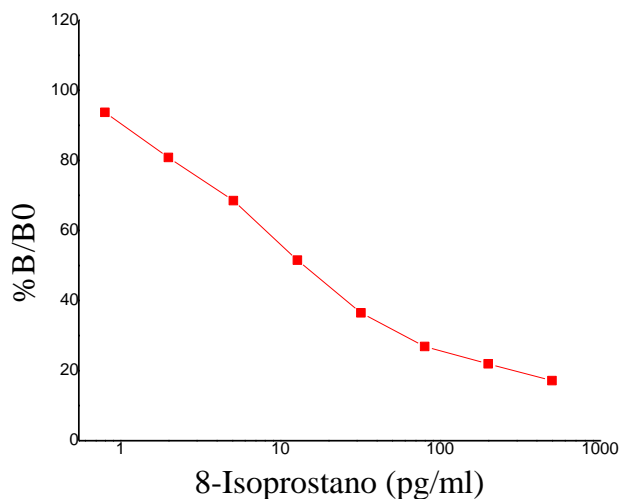
Se utilizó un Análisis Inmuno-enzimático (EIA) comercial (Cayman Chemical), para determinar los niveles plasmáticos de 8-isoprostano en ratas del grupo control y del grupo tratado con cadmio. Con las absorbancias obtenidas en este ensayo de todas las diluciones de la curva estándar (S1-S8), se calculó %B/B₀ y se confeccionó la curva estándar (Gráfico 11).

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

Tabla 10. Valores de la curva estándar 8-Isoprostano. Valores de %B/B₀ v/s cantidad de 8-isoprostano (pg/ml).

	(pg/ml)	% B/B ₀
S1	500	17,1
S2	200	21,9
S3	80	26,9
S4	32	36,5
S5	12,8	51,5
S6	5,1	68,5
S7	2	80,8
S8	0,8	93,7

Gráfico 11. Curva estándar 8-Isoprostano. Valores de %B/B₀ v/s cantidad de 8-isoprostano (pg/ml).



Para calcular la concentración de 8-isoprostano (pg/ml) de los plasmas en estudio, con las absorbancias obtenidas de las muestras se calculó %B/B₀ y estos valores fueron extrapolados en la curva estándar. Con respecto a las muestras de los plasma de las ratas del grupo control y del grupo tratado con cadmio, no se encontraron niveles detectables de 8-isoprostano por medio de éste método, ya que los valores calculados de %B/B₀ estaban bajo los valores de la curva estándar. No se observó diferencia en los valores de las absorbancias y de %B/B₀ del grupo control con respecto al grupo tratado con cadmio.

6. Determinación de la concentración del Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF

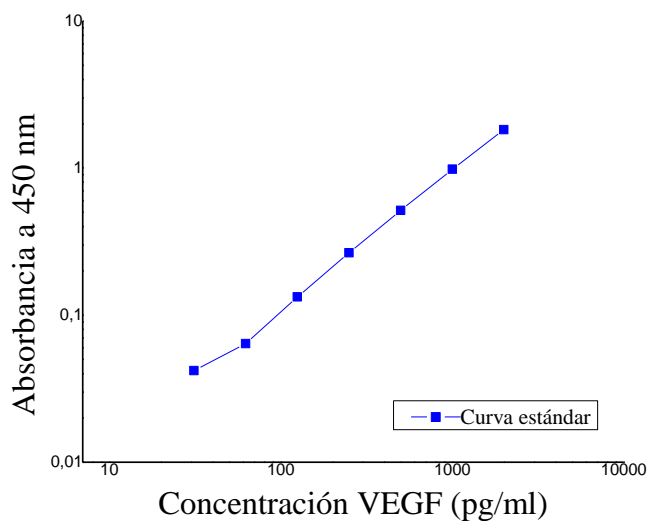
Para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de VEGF se utilizó un ensayo comercial de ELISA (Quantikine® Inmunoensayo VEGF de Rata, de la firma R&D Systems. Inc.)

Con los valores de las absorbancias corregidos de cada punto de la curva, se graficó la curva estándar (Gráfico 12). Para obtener estos valores corregidos, a las absorbancias obtenidas a 450 nm se le restó las lecturas a 570 nm para corregir las imperfecciones de la placa, y a cada valor corregido se le restó el blanco y se sacó un promedio de los duplicados, para cada estándar, control y muestra.

Tabla 11. Valores de la curva estándar VEGF. Valores de Absorbancia v/s cantidad de 8-isoprostano (pg/ml).

	(pg/ml)	Absorbancia 450 nm
S1	2000	1,827
S2	1000	0,982
S3	500	0,516
S4	250	0,265
S5	125	0,133
S6	62,5	0,064
S7	31,2	0,042

Gráfico 12. Curva estándar VEGF. Valores de absorbancia v/s concentración de VEGF (pg/ml).



Para calcular la concentración de VEGF (pg/ml) de los sueros en estudio, los valores de las absorbancias corregidos de cada muestra fueron extrapolados en la curva estándar. No se detectaron niveles de VEGF en los sueros de las ratas del grupo control ni en los sueros del grupo tratado con cadmio, ya que los valores de las absorbancias corregidos de las muestras estaban bajo los valores de la curva estándar. No se observó diferencia en los valores de las absorbancias del grupo control con respecto al grupo tratado con cadmio.

7. Determinación y cuantificación del mRNA del gen de la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1):

Se han estudiado los cambios de expresión a nivel de mRNA de genes implicados en el proceso de disfunción endotelial o daño del endotelio vascular como son HO-1 y VCAM-1 en el tejido aórtico de ratas control y tratadas con cadmio. El método de cuantificación que se usó se basa en la cuantificación relativa del gen problema (HO-1 y VCAM-1) respecto a un gen de referencia (β -actina).

Para comprobar la especificidad del producto de PCR se llevó a cabo el análisis de curvas de desnaturalización, con lo cual es posible confirmar la identidad del producto y la diferenciación de los productos inespecíficos, ya que cada población de DNAs tiene su temperatura media de fusión (T_m) específica.

Figura 5. Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de β -actina: Como se puede observar en la figura se muestra un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de la β -actina. La T_m del producto está alrededor de 89° C.

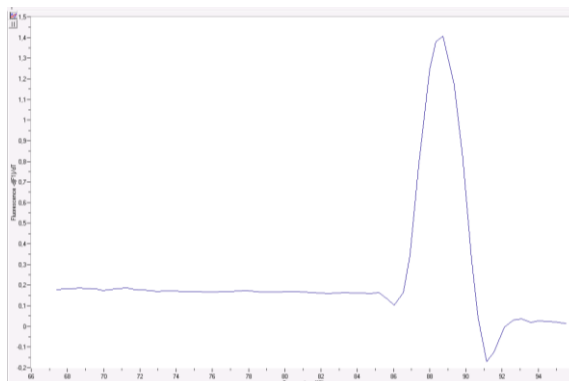


Figura 6. Análisis de la curva de desnaturalización para el gen HO-1: En la figura se muestra un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de la HO-1 y la Tm del producto está alrededor de 89° C.

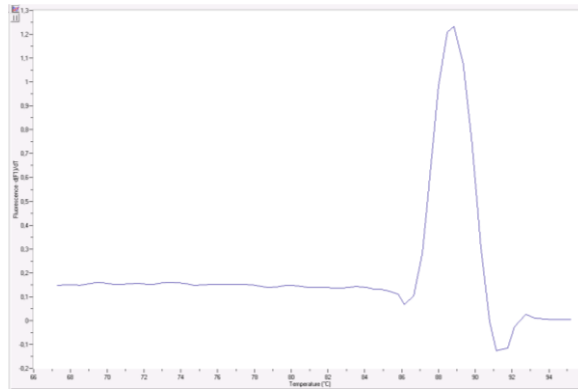
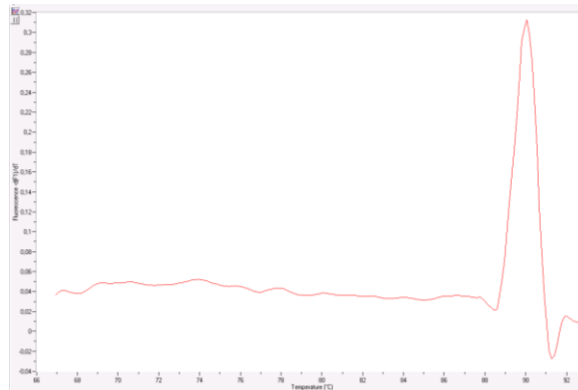


Figura 7. Análisis de la curva de desnaturalización para el gen VCAM-1: Se observa un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de la VCAM-1 y la Tm del producto está alrededor de 90° C.



Con la cuantificación relativa de la expresión génica para el gen HO-1 (Gráfico 13) y para el gen VCAM-1 (Gráfico 14), se obtiene una proporción de expresión relativa, lo que nos permite investigar los cambios fisiológicos en la expresión génica.

Gráfico 13. Expresión cuantitativa de mRNA de HO-1, mediante PCR a tiempo real, en tejido aórtico de ratas adultas hembra (H) y macho (M) del grupo control y del grupo tratado con cadmio.

a-b P = 0,001; a-c P= 0,02; b-c P=0,001.

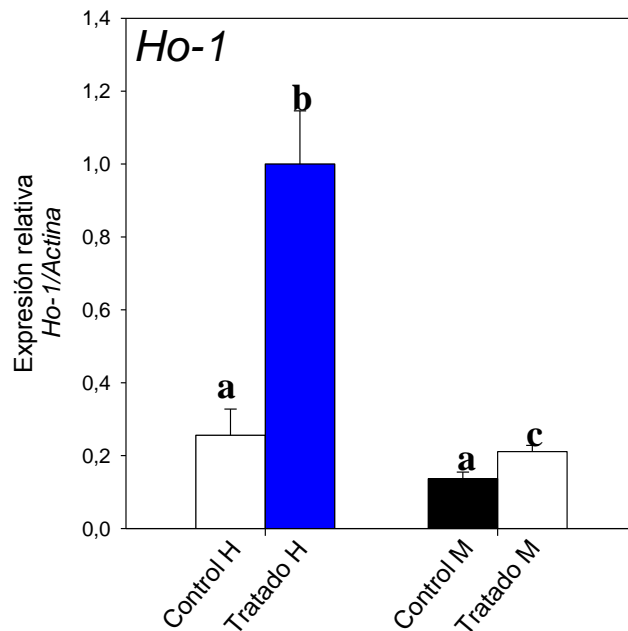
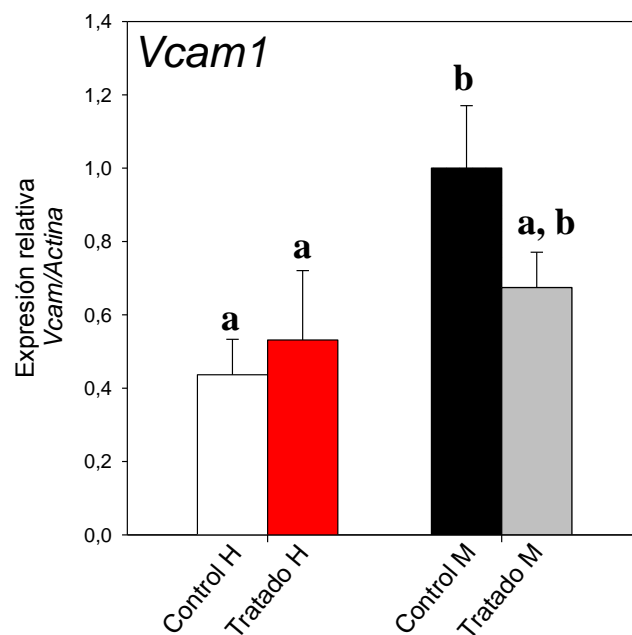


Gráfico 14. Expresión cuantitativa de mRNA de VCAM-1, mediante PCR en tiempo real, en tejido aórtico de ratas adultas hembra (H) y macho (M) del grupo control y del grupo tratado con cadmio.

a,b indican diferencias estadísticamente significativas, P = 0,03.



DISCUSIÓN

Durante el período de gestación, un grupo de ratas fueron expuestas a Cd^{2+} por medio del agua de bebida, como CdCl_2 en una dosis de 30 ppm de Cd^{2+} . En condiciones fisiológicas se ha estimado un 5% de absorción de Cd^{2+} ingerido en la dieta (alimento o agua contaminada con Cd^{2+}) a través del tracto gastrointestinal (Satarug y Moore, 2004), aunque se ha observado que durante la preñez el porcentaje de absorción aumenta a 10% (Herba et al, 2000, Leazer *et al.*, 2002).

Durante este período se controló diariamente al grupo 1 (control) y al grupo 2 (expuesto a Cd^{2+}), la ingesta de agua por medio de bebederos graduados y semanalmente se controló la ingesta de alimento y el peso de la madre. Los animales del grupo 2 disminuyeron el consumo de agua, lo cual se puede asociar a una menor palatabilidad del agua con Cd^{2+} para las ratas. Se realizó un cálculo teórico de ingesta diaria de Cd^{2+} , según el consumo diario de agua (27,5 ml) y los niveles de Cd^{2+} contenidos en el agua (30 ppm), siendo ésta de aproximadamente 0,84 mg diarios de Cd^{2+} . Considerando un promedio de absorción a través del tracto gastrointestinal de 10%, la concentración absorbida por estas ratas sería aproximadamente unos 0,084 mg de Cd^{2+} diario y durante la preñez una concentración total de 1,68 mg.

Aunque los grupos en estudio, presentaron diferencia en el consumo de agua, no hubo diferencia en el consumo de alimento, ni variación del peso semanal de las madres durante el período de gestación.

Los antecedentes descritos en la literatura sobre exposición a Cd^{2+} en humanos, correlaciona dosis de 5 ppm, 15 ppm y 50 ppm con niveles de exposición bajo, moderado y ocupacional respectivamente (Brzoska *et al.*, 2005). La dosis de exposición a Cd^{2+} utilizada en este estudio (30 ppm), no demostró ninguna alteración significativa en el peso de las placentas ni en el peso y talla de las crías al nacer.

Las primeras evidencias de efectos deletéreos a largo plazo se focalizaron en animales con retardo del crecimiento intrauterino como parámetro extremo del ambiente materno adverso y del grado de adaptación a esas condiciones. Sin embargo, hay evidencias recientes que demuestran que el retardo de crecimiento no es una condición para prever la existencia de condiciones intrauterinas adversas durante el desarrollo fetal ni la

vulnerabilidad futura de enfermedad (Gicqel, 2008). Los primeros estudios de la relación entre el peso de nacimiento y las enfermedades posteriores se centraron en la incidencia de la enfermedad cardiovascular, estudios más recientes han investigado la influencia del entorno prenatal sobre los mecanismos de programación como la disfunción del endotelio y el metabolismo lipídico anormal (Louey y Thornburg, 2005). En consecuencia, la vulnerabilidad del sistema cardiovascular puede ser programada sin alterar el peso de nacimiento (Louey y Thornburg, 2005).

Dependiendo de la dosis, ruta y duración de la exposición, el Cd^{2+} puede dañar varios órganos como pulmón, hígado, riñón, huesos, testículos y placenta (Prozialeck *et al.*, 2006). Las concentraciones de Cd^{2+} encontradas en las placentas de las ratas tratadas, nos confirma que el Cd^{2+} se acumula progresivamente en la placenta durante la gestación, y puede funcionar como barrera placentaria del transporte de Cd^{2+} al feto, ya que no se encontraron niveles detectables de Cd^{2+} en los fetos de madres tratadas. Hay controversia en el efecto de barrera de la placenta frente al Cd^{2+} ; varios estudios demuestran que no atraviesa la placenta, sin embargo, en humanos hay trabajos que reportan trazas de Cd^{2+} en sangre de cordón umbilical o leche de madres expuestas (Walker *et al.*, 2006; Nishijo *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2003). La forma en que el Cd^{2+} se conserva en la placenta, a diferencia del zinc y el cobre que son transferidos al feto no se entiende, ya que todos están unidos a la metalotioneina (Goyer y Cherian, 1992). En el presente modelo de rata preñada, no fue detectado Cd^{2+} en los fetos, por lo que se concluye que no atravesó la barrera placentaria. El presente estudio también demuestra que las crías no fueron expuestas a Cd^{2+} a través de la leche durante la lactancia, ya que no se detectó Cd^{2+} en las muestras de leche materna, ni en los órganos de las crías al destete (21 días de edad). En consecuencia, los efectos del Cd^{2+} sobre las crías son el resultado de una acción indirecta del Cd^{2+} alterando el tejido y la función placentaria, pero no por acción directa sobre el feto (Ramírez, 2002). Numerosas investigaciones en seres humanos, rumiantes y roedores han demostrado que el Cd^{2+} está pobremente distribuido en la leche, sugiriendo que la glándula mamaria puede actuar como una barrera de protección para el lactante de la exposición al metal (Ohrvik *et al.*, 2006).

Se han realizado diferentes estudios tendientes a comprender los mecanismos de toxicidad fetal del Cd^{2+} , en donde se administró CdCl_2 vía subcutánea en ratas de 18 días de gestación, lo que produjo una alta incidencia de muerte fetal y de necrosis de la placenta (Levin *et al.*, 1981). En otras ratas se inyectó CdCl_2 directamente en el útero, en este caso, los fetos fueron resistentes a los niveles de Cd^{2+} muy por encima de los niveles fetales asociadas con la muerte fetal. Así, la muerte fetal inducida por Cd^{2+} no fue el resultado de un efecto directo de Cd^{2+} en el feto, pero puede ser el resultado de un efecto en la placenta (Levin *et al.*, 1981). Un mecanismo propuesto, para tal efecto correspondería a que la alta acumulación de Cd^{2+} en la placenta genera un daño en el trofoblasto y una disminución en el flujo sanguíneo uteroplacental (Levin *et al.*, 1981).

El Cd^{2+} que se acumula en la placenta puede generar una disfunción placentaria y así inducir una reprogramación fetal (RF), con consecuencias adversas relevantes a largo plazo. Se ha encontrado que en madres fumadoras, en las cuales la exposición a Cd^{2+} es a través del humo de tabaco, los niveles de Cd^{2+} placentarios son significativamente mayores que en mujeres no fumadoras, además existe una alta correlación negativa entre estos niveles de Cd^{2+} en placenta y peso de nacimiento de sus hijos (Ronco *et al.*, 2005a).

Numerosos estudios clínicos y experimentales apoyan la hipótesis de que el ambiente intrauterino es un importante determinante de las enfermedades cardiovasculares y la hipertensión (Grigore *et al.*, 2008). Diversos estudios, en los que se han usado una variedad de especies animales y protocolos experimentales muestran que el estrés prenatal lleva a una función deprimida del endotelio en las crías y que esos deterioros contribuyen al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Louey y Thornburg, 2005). Los estudios recientes, destacan la relación de la exposición a Cd^{2+} y las enfermedades vasculares, indicando que las células del endotelio vascular son el objetivo de toxicidad del Cd^{2+} (Dong *et al.*, 2009). La disfunción del endotelio juega un importante rol en el desarrollo de la arteriosclerosis y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Louey y Thornburg, 2005).

En este estudio, para evaluar la funcionalidad del endotelio vascular, se determinó la reactividad vascular en las aortas de la generación F1 en la edad adulta. La relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina (ACh) fue dependiente del género, observándose una mayor respuesta de relajación en machos que en hembras. Robert *et al.*

(2005) reportó una mayor respuesta contráctil a epinefrina en ratas no hipertensas machos que en hembras. Este dimorfismo sexual se mantiene también en la respuesta a nitroprusiato de sodio (NPS), dador de NO que permiten determinar la relajación endotelio independiente.

Se ha demostrado que existe una susceptibilidad diferente en hombres y mujeres a los efectos de metales pesados en general y de Cd^{2+} en particular sobre la salud, siendo mayor los 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. Si esto se debe a diferencias en la sensibilidad a los efectos tóxicos o simplemente refleja la mayor carga corporal de Cd^{2+} observada en la mujer no está totalmente claro (Vahter *et al.*, 2007). En este estudio, se observó una menor respuesta a la relajación inducida por ACh y por NPS en las hembras, tanto del grupo expuesto a Cd^{2+} como en el grupo control. Se sabe que el Cd^{2+} puede activar los receptores de estrógenos endógenos que se encuentran en el endotelio vascular y músculo liso. (Nesatyy *et al.*, 2006). Los estrógenos afectan indirectamente el tono vascular por la modulación de la liberación de factores vasoactivos derivados del endotelio y directamente por la modulación de calcio intracelular en las células del músculo liso vascular (Miller, 1999). Se ha demostrado que la aorta de conejo hembra muestra una mayor liberación basal de NO que la aorta de conejo macho (Hayashi *et al.*, 1992). Los efectos de los estrógenos sobre la estructura y función vascular han sido estudiado extensamente, sin embargo, existen pocos estudios sobre los posibles efectos de los andrógenos en la fisiología arterial (McCrohon *et al.*, 2000). En estudios *in vitro* con anillos de aorta y de arteria coronaria de rata, conejo y cerdo se ha encontrado que la testosterona incrementa la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente del endotelio, sin embargo, este efecto se desvanece en animales experimentalmente hipercolesterolémicos o expuestos al humo del tabaco (McCrohon *et al.*, 2000). La vasodilatación independiente del endotelio se atenúa con el desarrollo en la hembra y en el macho dicha respuesta se incrementa hasta llegar a un máximo que coincide con el desarrollo sexual determinado por la testosterona; esto indica que la hormona masculina confiere una mayor propiedad vasodilatadora independiente del endotelio a las arterias de las ratas macho. Se desconoce si este hecho ocurre también en el humano (Romero *et al.*, 2002). Similar respuesta se observó en el presente estudio, ya que

la relajación inducida por NPS fue mayor en los machos. En este estudio la menor relajación de las aortas de las ratas hembras frente a las ratas macho, independientemente de la liberación de NO, apunta a la participación de factores endoteliales y no endoteliales en esta diferencia de género. Además, como las hembras son más susceptibles a los efectos tóxicos del cadmio, esta menor vasodilatación se puede relacionar a un mayor daño y disfunción endotelial.

En relación al efecto del tratamiento prenatal con Cd^{2+} , el grupo expuesto prenatalmente a Cd^{2+} mostró una relajación disminuida a la ACh en relación al grupo control, tanto en hembras como en machos; este efecto no se observó en la respuesta de relajación inducida por NPS. Estos resultados demuestran claramente que el tratamiento *in útero* con 30 ppm de Cd^{2+} solo afecta la relajación endotelio-dependiente y no afecta la respuesta endotelio-independiente. Una respuesta endotelio-dependiente disminuida es concordante con una disfunción endotelial (Rigla *et al.*, 2001). La disminución de la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente del grupo expuesto prenatalmente a Cd^{2+} , podría deberse a efectos sobre la producción y disponibilidad de NO por ser el vasodilatador más potente generado por el endotelio. Además, se ha demostrado que el Cd^{2+} inhibe la producción de NO endotelial (Kolluru *et al.*, 2006). El NO es producido por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), y no sólo tiene importancia en la regulación del tono vascular, ya que reduce también el grado de activación de plaquetas y leucocitos impidiendo su agregación y adhesión a la pared del vaso (Rigla *et al.*, 2001). La falta de relajación a través del sistema NO se ha definido como disfunción endotelial. La disfunción endotelial, entendida como una reducción en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio se ha detectado en prácticamente todas las patologías de origen cardiovascular. La disfunción del endotelio existe no solo cuando las manifestaciones clínicas de la patología cardiovascular son evidentes, sino también ocurre incluso antes de que se pueda detectar daño vascular. El mecanismo de la disfunción es un tema complejo que aún no ha sido completamente identificado (Rigla *et al.*, 2001). Estudios sugieren que el Cd^{2+} es mediador de la disfunción endotelial y se asocia con una baja biodisponibilidad de NO, inhibiendo la NOS (Kolluru *et al.*, 2006). El Cd^{2+} puede antagonizar las acciones vasoconstrictoras de la endotelina y puede inhibir la liberación y/o las acciones de las sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio, tales como prostanoides y NO (Prozialeck *et al.*, 2006). El Cd^{2+} y

otros metales pesados tienen una alta afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH), inactivando numerosas reacciones enzimáticas, aminoácidos y antioxidantes que contienen sulfuro, con la consiguiente disminución de la defensa oxidante y el aumento de estrés oxidativo (Houston, 2007). El estrés oxidativo disminuye la formación de NO y en consecuencia disminuye la vasodilatación dependiente de endotelio (Tzotzes *et al.*, 2007).

La disfunción endotelial promueve la expresión de varias proteínas involucradas en la adhesión de leucocitos y plaquetas (Libby y Li, 1993). El endotelio disfuncional expresa moléculas de adhesión como la VCAM-1, que va a favorecer el contacto entre los leucocitos circulantes y el endotelio (Bevilacqua, 1993). La disfunción endotelial está especialmente relacionada con el reclutamiento de los leucocitos durante la formación de la lesión aterosclerótica. VCAM-1 es expresada por el endotelio arterial en las lesiones ateroscleróticas tempranas en un modelo experimental de aterosclerosis en conejo y podría ser responsable de la atracción de las células mononucleares que desarrollan la lesión aterosclerótica. Otros autores han demostrado con anterioridad que VCAM-1 es expresada ampliamente sobre células endoteliales de arterias ocluidas durante la aterosclerosis acelerada (Macías *et al.*, 2003).

La expresión aumenta en células endoteliales con daño crónico asociado a factores de riesgo de arteriosclerosis como tabaquismo, hipertensión e hipercolesterolemia (Rigla *et al.*, 2001). En este estudio, no hubo diferencia en los niveles de expresión de VCAM-1 entre el grupo expuesto a Cd²⁺ y el grupo control. Así, podemos concluir, que la exposición prenatal a Cd²⁺, no modificó la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, pese a la disfunción del endotelio que presentó este grupo en estudio. Sin embargo, se observó una diferencia de género en el grupo control, ya que en los machos la expresión de VCAM-1 fue significativamente mayor que en las hembras. Estudios en humanos han demostrado que la testosterona aumenta la adhesividad de los monocitos a las células endoteliales y estas expresan con mayor intensidad la molécula de adhesión VCAM-1 (Romero *et al.*, 2002). Por otra parte, la mejor adhesión de los monocitos, dada por los andrógenos, se ha relacionado con problemas en la reactividad vascular (McCrohon *et al.*, 2000). Curiosamente, el estrógeno disminuye la expresión de molécula de adhesión en las células endoteliales y monocitos. Esto puede ser un mecanismo importante en la mayor susceptibilidad de los hombres para el desarrollo de aterosclerosis prematura (McCrohon *et*

al., 2000). Se puede concluir, que la diferencia de género en la expresión de VCAM-1 puede estar dada por la participación de las hormonas sexuales.

Como se mencionó anteriormente, las células del endotelio vascular son el principal “blanco” de toxicidad del Cd^{2+} . Entre los mecanismos bioquímicos propuestos para explicar los efectos citotóxicos del Cd^{2+} , se encuentra la habilidad del Cd^{2+} para inducir estrés oxidativo (Prozialeck *et al.*, 2006). Diversas especies oxidativas y radicales libres se producen durante el tabaquismo y llevar a inflamación y disfunción endotelial (Chen *et al.*, 2009). Se ha establecido claramente, que los radicales libres contribuyen a la disfunción endotelial y están involucrados en el envejecimiento y la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares (Vassale *et al.*, 2003). Ya que la cuantificación del estrés oxidativo resulta de gran relevancia para la comprensión de mecanismos fisiopatológicos y de toxicidad del Cd^{2+} , en este estudio determinamos los niveles plasmáticos de 8-isoprostano, como marcador de estrés oxidativo. En particular, el 8-isoprostano está considerado como un marcador de déficit de antioxidantes y de estrés oxidativo para evaluar patología vascular y actualmente es el método más confiable para determinar el estrés oxidativo *in vivo* (Vassale *et al.*, 2003). Los niveles de 8-isoprostano, tanto libres en la circulación sanguínea como esterificados en los fosfolípidos tisulares, aumentan considerablemente en los daños oxidativos en modelos con animales. Otros estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de 8-isoprostano eran significativamente más altos en los fumadores que en los no fumadores, y se demostró que los niveles cayeron significativamente después de 2 semanas de abstinencia a fumar y alcanzando valores cercanos a los de no fumadores 4 semanas después de dejar el tabaco (Morrow *et al.*, 1995).

En este estudio, los niveles plasmáticos de 8-isoprostano estuvieron bajo el nivel de detección del inmunoensayo utilizado. Estos resultados se pueden asociar a que su vida media es muy corta y una vez liberados en la circulación son rápidamente metabolizados y eliminados (Calmarza, 2008).

Se han presentado evidencias sobre cómo varios estímulos de estrés oxidativo pueden causar disfunción de células endoteliales y cómo HO-1 puede contrarrestar los efectos dañinos del estrés oxidativo en el endotelio (Immenschuh y Shröder, 2006). La HO-1 es inducida además por CdCl_2 , óxido nítrico y LDL oxidada (Hill- Kapturczak *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el humo del tabaco es una potente fuente de oxidantes que

conducen a estrés oxidativo, induciendo la expresión de proteínas HO-1 en monocitos humanos normales (Favatier y Polla, 2001). En este estudio hemos examinado la expresión de HO-1, enzima inducible por Cd^{2+} , en la aorta torácica de ratas. La expresión de HO-1 (mRNA) aumentó significativamente en las aortas de ratas expuestas a Cd^{2+} durante la gestación, tanto en hembras como en machos, aunque en hembras el efecto fue mayor. De esta forma, como una defensa contra tal toxicidad, las células endoteliales sobre regulan la expresión de HO-1. Estos resultados son consistentes con nuestros hallazgos previos que sugieren que el Cd^{2+} genera estrés oxidativo y disfunción endotelial. Los efectos protectores de la HO-1 en contra la disfunción endotelial aórtica puede ser debido a su efecto antioxidante y regulador de sustancias vasoactivas. Se ha demostrado que la inducción de la expresión y actividad de HO-1 en aortas reducían la generación de radicales libres (Datla *et al.*, 2007). La inducción de HO-1 en aorta está asociada con protección celular especialmente contra insulto oxidativo y puede representar uno de los muchos mecanismos de protección generados contra el estrés que produce una exposición materna a Cd^{2+} (Morita *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos sugieren que de alguna manera el feto percibió ese estrés materno y moduló respuestas biológicas contra el estrés las que se mantuvieron en la edad adulta. Bajo estas condiciones se explica que no se haya podido detectar niveles de 8-isoprostanos en el plasma de los animales expuestos a Cd^{2+} *in útero*, aparte de la enorme capacidad que tiene el plasma de contrarrestar el estrés oxidativo ya sea por moléculas especializadas como glutatión o por sus sistemas enzimáticos antioxidantes (SOD, catalasa, GPx etc). HO-1 protege las células endoteliales de la apoptosis, participan en la relajación de los vasos sanguíneos, regulación del tono vascular, atenúa la respuesta inflamatoria en la pared del vaso, y participa en la angiogénesis (Lobota *et al.*, 2008).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor angiogénico producido por una variedad de células, incluidas las células endoteliales, con receptores específicos en el endotelio. VEGF contribuye a la respuesta inflamatoria a través de la estimulación de la liberación de moléculas de adhesión, metaloproteinasas y óxido nítrico, a través de la transcripción del factor activador de proteína-1 (AP-1) (Galley y Webster, 2004). Las concentraciones séricas de VEGF se correlacionaron inversamente con la vasodilatación endotelio-dependiente en humanos (Schmidt-Lucke *et al.*, 2005); de acuerdo a estos resultados se debería haber esperado un aumento de los niveles circulantes de VEGF

en los animales con una vasodilatación endotelio-dependiente disminuida, sin embargo en nuestro estudio, los niveles de VEGF en suero estuvieron bajo el nivel de detección del inmunoensayo utilizado.

Los presentes resultados y los disponibles en la literatura permiten concluir que la exposición prenatal a Cd^{2+} genera un ambiente intrauterino adverso, induciendo una reprogramación fetal del desarrollo sobre la base de su medio ambiente intrauterino, el cual al no coincidir con el entorno del medio postnatal coloca al individuo en situación de riesgo de enfermedades en etapas posteriores.

Se evidenció una alteración del fenotipo cardiovascular: disfunción del endotelio vascular acompañado de cambios en la expresión de HO-1 en aortas de ratas adultas expuestas a Cd^{2+} durante la gestación.

Aunque no se profundizó en los mecanismos moleculares involucrados, es posible pensar que en los fetos expuestos prenatalmente a Cd^{2+} podrían haber ocurrido alteraciones epigenéticas que explican la mantención del fenotipo y patrón genético en la adultez.

La presencia de disfunción endotelial es hoy día una de las características mejor definidas de múltiples procesos cardiovasculares. Si es el mecanismo desencadenante o precoz que conduce a una alteración más avanzada y severa, o si es sencillamente una manifestación precoz de múltiples trastornos cardiovasculares es un tema debatido.

Estudios han demostrado que efectos cardíacos de programación puede ser inducido por alteraciones en la dieta materna, la exposición fetal a niveles elevados de corticoides, hipoxia fetal crónica y la anemia, y el uso de la nicotina o la cocaína durante la gestación (Meyer y Lubo, 2007).

Este estudio demuestra por primera vez, que la exposición a metales pesados como el cadmio durante la gestación puede conducir a una reprogramación fetal cardiovascular.

CONCLUSIONES

1. La exposición de ratas preñadas a 30 ppm de Cd^{2+} durante todo el período de preñez no indujo alteración significativa en el peso y talla de nacimiento de las crías, ni en el peso de las placentas.
2. Sólo se encontraron trazas de Cd^{2+} en las placentas de las ratas expuestas, lo que demuestra que el Cd^{2+} se acumula en la placenta durante la gestación. No se detectó Cd^{2+} en las crías de madres expuestas, lo que confirma que Cd^{2+} no atraviesa la placenta.
3. No se detectó Cd^{2+} en leche materna ni en los órganos de las crías al destete (21 días de edad) lo que indica que las crías F1 no recibieron Cd^{2+} a través de la lactancia materna, y sugiere que la glándula mamaria puede actuar como una barrera de protección.
4. Los animales expuestos a Cd^{2+} durante la gestación mostraron una reactividad vascular endotelio-dependiente alterada a los 60 días de edad concordante con una disfunción endotelial. Este efecto fue mayor en hembras que en machos, lo que se explica por la mayor susceptibilidad de las hembras a los efectos tóxicos de metales pesados en general y al cadmio en particular. No se encontró efectos de tratamiento en la respuesta endotelio-independiente.
5. Las crías F1 hembras en estado adulto (60 días) mostraron una menor vasodilatación, tanto endotelio-dependiente como endotelio-independiente en relación a los machos, lo que demuestra que en esta diferencia de género participan factores endoteliales y no endoteliales.

6. La exposición prenatal a Cd^{2+} , no modificó la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, pese a la disfunción del endotelio que presentó este grupo en estudio. Sin embargo, se observó una diferencia de género en el grupo control, ya que en los machos la expresión de VCAM-1 fue significativamente mayor que en las hembras. Esta diferencia de género se puede explicar por la presencia de mayores niveles de estrógenos en las hembras, hormona que disminuye la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y monocitos.

7. La exposición prenatal a Cd^{2+} , no modificó los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos ni de VEGF.

8. La expresión de HO-1, enzima inducible por Cd^{2+} y por estrés oxidativo, aumentó significativamente en aorta de ratas adultas expuestas a Cd^{2+} durante la gestación, tanto en hembras como en machos, aunque en hembras el efecto fue mayor.

9. Este estudio presenta por primera vez evidencias experimentales claras que demuestran que la exposición prenatal a metales pesados como el Cd^{2+} , puede conducir a una reprogramación fetal del desarrollo cardiovascular. Esta observación se basa en el hallazgo que en las crías expuestas, se induce, a largo plazo, una disfunción endotelial del tejido aórtico, proceso inicial característico del desarrollo de patología cardiovascular. El aumento en la expresión de HO-1 sugiere que los efectos observados estarían mediados por estrés oxidativo inducido por Cd^{2+} . Es relevante la demostración que la plasticidad del desarrollo cardiovascular puede ocurrir en ausencia de una disminución del peso de nacimiento de las crías.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABRAHAM, N.; KAPPAS, A.** 2005. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Biol. Medical.* 39: 1-25.

- **ALONSO, C.; GONZALEZ, A.; MAZARRASA, O.; GÜEZMES, A.; SANCHEZ, S.; MARTINEZ, C.; COS, S.; SANCHEZ, EJ.; MEDIAVILLA, MD.** 2007. Melatonin prevents the estrogenic effects of sub-chronic administration of cadmium on mice mammary glands and uterus. *J. Pineal. Res.* 42:403-10.

- **ARMITAGE, J.; KHAN, I.; TAYLOR, P.; NATHANIELSZ, P.; POSTON, L.** 2004. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?. *J. Physiol.* 561: 355-377.

- **BARKER, D.; CLARK, P.** 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev. Reprod.* 2:105-112.

- **BERRAZUETA, J.** 2004. Evaluación no invasiva de la función endotelial. *Arch. Cardiol. Mex.* Vol. 74, Supl. 2, S537-S541.

- **BERTRAM, C.; HANSON, M.** 2001. Animal models and programming of the metabolic síndrome. *Br. Med. Bull.* 60: 103-121.

- **BEVILACQUA, MP.** 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Ann. Rev. Immunol.* 11: 77-804.

- **BOGDARINA, I.; MURPHY, H.; BUMS, S.; CLARK, A.** 2004. Investigation of the role of epigenetic modification of the rat glucokinase gene in fetal programming. *Life. Sci.* 74: 1407-1415.

- **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.

- **CALMARZA, P.** 2008. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Electrón. J. Biomed.* 3: 52-60.

- **CHEN, HW.; LIU, CK.; KU, HJ.; WANG, TS.** 2009. Cigarette smoke extract induces expression of cell adhesion molecules in HUVEC via actin filament reorganization. *Environ. Mol. Mutagen.* 50: 96-104.

- **CHUNG, H.; PAE, H.; CHA, Y.** 2008. Role of heme oxygenase-1 in vascular disease. *Curr. Pharm. Des.* 14: 422-8.

- **CRACOWSKI, JL.; STANKE-LABESQUE, F.; SOUVIGNET, C.; BESSARD, G.** 2000. Isoprostanes: new markers of oxidative stress in human diseases. *Presse. Med.* 29: 604-10.

- **CRACOWSKI, JL.; DEVILLIER, P.; DURAND, T.; STANKE-LABESQUE, F.; BESSARD, G.** 2001. Vascular biology of the isoprostanes. *J. Vasc. Res.* 38: 93-103.

- **DATLA, S.; DUSTING, G.; MORI, T.; TAYLOR, C.; CROFT, K.; JIANG, F.** 2007. Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension.* 50: 636-42.

- **DE RUITER, MC.; ALKEMADE, FE.; GITTENBERGER-DE GROOT, AC.; POELMANN, RE.; HAVEKES, LM.; VAN DIJK, KW.** 2008. Maternal transmission of risk for atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 19: 333-7.

- **DONG, Z.; WANG, L.; XU, J.; LI, Y.; ZHANG, S.; MIAO, J.** 2009. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. *Toxicol. In Vitro.* 23:105-110.

- **FAVATIER, F.; POLLA, B.** 2001. Tobacco-smoke-inducible human oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates. *Biochem. J.* 353: 475-82.

- **FOWDEN, AL.; GIUSSANI, DA.; FORHEAD, AJ.** 2006. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology.* (Bethesda). 21:29-37.

- **GALLEY, H.; WEBSTER, N.** 2004. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* 93: 105-13.

- **GALLOU-KABANI, C.; JUNIEN, C.** 2005. Nutricional epigenomics of metabolic síndrome. New perspective against the epidemic. *Diabetes.* 54: 899-1906.

- **GICQUEL, C.** 2008. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best. Practic. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol. 22, No. 1, pp. 1–16.

- **GODFREY, K; BARKER, D.** 2000. Fetal nutrition and adult disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1344S-52S.

- **GODFREY, K; BARKER, D.** 2001. Fetal programming and adult health. *Public. Health. Nutr.* 4: 611-624.

- **GOYER, R.; CHERIAN, M.** 1992. Role of metallothionein in human placenta and rats exposed to cadmium. *IARC. Sci. Publ.* 118: 239-47.

- **GRIGORE, D.; OJEDA, N.; ALEXANDER, B.** 2008. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gend. Med.* 5 Suppl A:S121-32.

- **HAYASHI, T.; FUKUTO, J.; IGNARRO, L.; CHAUDHURI, G.** 1992. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11259-63.

- **HENSON, M.; CHEDRESE, J.** 2004. Endocrine disruption by cadmium a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Biol. Medical.* 229:383-392.

- **HEO, J.; KIM, H.; PARK, M.; KANG, Y.; LEE, Y.; SEO, H.; LEE, J.; YUN-CHOI, H.; CHANG, K.** 2007. YS 51, 1-(beta-naphtylmethyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinoline, protects endothelial cells against hydrogen peroxide-induced injury via carbon monoxide derived from heme oxygenase-1. *Biochem. Pharmacol.* 21: 660-751.

- **HERBA, E.; POJDA-WILCZEK, D.; POJDA, S.; BRUS, R.; PLECH, 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.

- **HEYWOOD, W.; MIAN, N.; MILLA, P.; LINDLEY, K.** 2004. Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from dams fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin. Sci.* 107: 37-45.

- **HILL-KAPTURCZAK, N.; SIKORSKI, E.; VOAKES, C.; GARCIA, J.; NICK, H.; AGARWAL, A.** 2003. An internal enhancer regulates heme- and cadmium-mediated induction of human heme oxygenase-1. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285: 515–523.

- **HONDA, R.; TAWARA, K.; NISHIJO, M.; NAKAGAWA, H.; TANEBE, K.; SAITO, S.** 2003. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. *Toxicology* 186: 255- 259.

- **HOUSTON, MC.** 2007. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern. Ther. Health. Med.* 13:S128-33.

- **HU, CZ.; CAO, YL., HUO, HY.; ZHAO, WH.; HU, J.** 2009. Inhibitory Effect of Ghrelin on Nicotine-induced VCAM-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 53: 241-5.

- **IMMENSCHUH, S.; SCHODER, H.** 2006. Heme oxygenase-1 and cardiovascular disease. *Histol. Histopathol.* 2: 679-85.

- **JACQUILLET, G.; BARBIER, O., RUBERA, I.; TAUC, M.; BORDERIE, A.; NAMORADO, MC.; MARTIN, D.; SIERRE, G., REYES, JL.; POUJEOL, P.; COUGNON, M.** 2007. Cadmium causes delayed effects on renal function in the offspring of cadmium-contaminated pregnant female rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 293:F1450-60.

- **JANSSON, T.; POWELL, TL.** 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci.* 113:1-13.

- **JÄRUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER,C.; NORDBERG, G.; VAHTER, M.** 1998. Health effects of cadmium exposure a review of the literature and risk estimate. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 24: 1-52.

- **JÄRUP, L.** 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68:167-82.

- **JOHNSON, MD.; KENNEY, N.; STOICA, A.; HILAKIVI-CLARKE, L.; SINGH, B.; CHEPKO, G.; CLARKE, R.; SHOLLER, PF.; LIRIO, AA.; FOSS, C.; REITER, R.; TROCK, B.; PAIK, S.; MARTIN, MB.** 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat. Med.* 9: 1081-4.

- **KIM, Y.** 2005. Nutricional Epigenics: Impacto of Folate Deficiency on DNA Methylation and colon cancer susceptibility. *J. Nutr.* 135: 2703-2709.

- **KING, LM.; BANKS, WA.; GEORGE, WL.**1999. Differences in cadmium transport to the testis, epididymis, and brain in cadmium-sensitive and -resistant murine strains 129/J and A/J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 825-30.

- **KOIZUMI, S.; GONG, P.; SUZUKI, K.; MURATA, M.** 2007. Cadmium-responsive element of the human heme oxygenase-1 gene mediates heat shock factor 1-dependent transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 282: 8715-23.

- **KOLLURU, GK.; TAMILARASAN KP.; GEETHA, PS.; DURGHA, NP.; CHATTERJEE, S.** 2006. Cadmium induced endothelial dysfunction: Consequence of defective migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. *Cell. Biol.Int.* 30: 427- 438.

- **KOUKKOU, E., GHOSH, P.; LOWY, C.; POSTON, L.** 1998. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. *Circulation.* 98: 2899-2904.

- **KOUMENTAKI, A.; ANTHONY, F.; POSTON, L.; WHEELER, T.** 2002. Low-protein diet impairs vascular relaxation in virgin and pregnant rats. *Clin. Sci. (Lond).* 102: 553-560.

- **KUHNERT, B.; KUHNERT, P.; DEBANNE, S.; WILLIAMS, T.** 1987. The relationship between cadmium, zinc, and birth weight in pregnant women who smoke. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 1247-1251.

- **KULICZKOWSKI, W.; JOLDA, B.; KOBUSIAK, M.; ANTONOWICZ, J.; KOSMALA, W.** 2004. Effect of heavy metal ions on function of vascular endothelium in patients with ischemic heart disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 111: 679-85.

- **KURIWAKI, J.; NISHIJO, M.; HONDA, R.; TAWARA, K.; NAKAGAWA, H.; HORI, E.; NISHIJO, H.** 2005. Effects of cadmium exposure during pregnancy on trace elements in fetal rat liver and kidney. *Toxicol. Lett.* 156: 369-376.

- **KWONG, W.; WILD, A.; ROBERTS, P.; WILLIS, A.; FLEMING, T.** 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development.* 127: 4195-4202.

- **LANGLEY- EVANS, S.; PHILLIPS, G.; JACKSON, A.** 1996a. Fetal exposure to low protein maternal diet alters the susceptibility of young adult rats to sulfufr dioxide-induced lung injury. *J Nutr.* 127: 202-209.

- **LANGLEY- EVANS, S.; PHILLIPS, G.; BENEDIKTSSON, R.; GARDNER, D.; EDWARDS, C.; JACKSON, A.; SECKL, J.** 1996b. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension. *Placenta.* 17:169-172.

- **LANGLEY- EVANS, S.** 2000. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 51: 11-17.

- **LEAZER, T; LIU, Y; KLASSEN, C.** 2002. Cadmium absorption and its relationship to divalent metal transporter-1 in the pregnant rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185: 18-24.

- **LEVIN, AA.; PLAUTZ, JR.; DI SANT` AGNESE, PA.; MILLER, RK.** 1981. Cadmium: placental mechanisms of fetal toxicity. *Placenta Suppl.* 3:303-18.

- **LIBBY, P.; LI, H.** 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 92:538-9.

- **LOBODA, A.; JAZWA, A.; GROCHOT-PRZECZEK, A.; RUTKOWSKI, AJ.; CISOWSKI, J.; AGARWAL, A.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J.** 2008. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.* 10:1767-812.

- **LONGO, L.; PEARCE, W.** 2005. Fetal cerebrovascular acclimatization responses to high- altitud, long-term hypoxia: a model for prenatal programming of adult disease?. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R16-R24.

- **LOUEY, S.; THORNBURG, K.** 2005. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early. Hum. Dev.* 81: 745-751.

- **LUCAS, A.** 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba. Found. Symp.* 156: 38-50.

- **MACIAS, C.; VILLAESCUSA, R.; DEL VALLE, L.; BOFFIL, V.; CORDERO, G.; HERNANDEZ, A.; HERNANDEZ, P.; BALLESTER, JM.** 2003. Endothelial Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Rev. Esp. Cardiol.* 56:137-44.

- **MANNARINO, E.; PIRRO, M.; CORTESE, C.; LUPATTELLI, G.; SIEPI, D.; MEZZETI, A.; BERTOLINI, S.; PARILLO, M.; FELLIN, R.; PUJIA, A.; AERNA, M.; NICOLLE, C.; NOTARBARTOLO, A.** 2009. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis* 19: 84-90.

- **MARTÍNEZ, L.** 2008. Programación fetal de enfermedades expresadas en la etapa adulta. *Med. Univer.*10:108-13.

- **McCROHON, J.; DEATH, A.; NAKHLA, S.; JESSUP, W.** 2000. Androgen receptor expression is greater in macrophages from male than from female donors. *Circulation*. 101: 224-226.

- **McMILLEN, I.; ROBINSON, J.** 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev.* 85: 571-633.

- **MEYER, K.; LUBO, Z.** 2007. Fetal programming of cardiac function and disease. *Reprod. Sci.* 14: 209-16.

- **MILLER, VM.** 1999. Gender and vascular reactivity. *Lupus*. 8: 409-15.

- **MISRA, D., ASTONE, N.; LYNCH, C.** 2005. Maternal smoking and birth weight interaction with parity and mother`s own in utero exposure to smoking. *Epidemiology*. 16: 288-293.

- **MLYNEK, V.; SKOCZYNSKA, A.** 2005. The proinflammatory activity of cadmium. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 59:1-8.

- **MORITA, T.; IMAI, T.; SUGIYAMA, T.; KATAYAMA, S.; YOSHINO, G.** 2005. Heme oxygenase-1 in vascular smooth muscle cells counteracts cardiovascular damage induced by angiotensin II. *Curr. Neurovasc. Res.* 2: 113-20.

- **MORROW, J.; FREI, B.; LONGMIRE, A.; GAZIANO, J.; LYNCH, S.; SHYR, Y.; STRAUSS, W.; OATES, J.; ROBERT, L.** 1995. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl. J. Med.* 332:1198-203.

- **MURATA, M.; GONG, P.; SUZUKI, K.; KOIZUMI, S.** 1999. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J. Cell. Physiol.* 180:105-13.

- **MYATT, L.** 2006. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* 572: 25-30.

- **NESATYY, V.; AMMANN, A.; RUTISHAUSER, B.; SUTER, M.** 2006. Effect of cadmium on the interaction of 17beta-estradiol with the rainbow trout estrogen receptor. *Environ. Sci. Technol.* 40:1358-63.

- **NISHIJO, M.; NAKAGAWA, H.; HONDA, R.; TANEBE, K.; SAITO, S.; TERANISHI, H.; TAWARA, K.** 2002. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occup. Environ. Med.* 59: 394-397.

- **OHRVIK, H.; YOSHIOKA, M.; OSKARSSON, A.; TALLKVIST, J.** 2006. Cadmium-induced disturbances in lactating mammary glands of mice. *Toxicol. Lett.* 164: 207–213.

- **OZANNE, S.; MARTENSZ, N.; PETRY, C.; LOIZOU, C.; HALES, C.** 1998. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia.* 41: 1337-1342.

- **OZANNE, S.; HALES, C.** 2003. Match-up growth and obesity in male mice. *Nature.* 427: 411-412.

- **PIASEK, M.; BLANUSA, M.; KOSTIAL, K.; LASKEY, J.** 2001. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. *Reprod. Toxicol.* 15: 673-681.

- **PICOLI, LC.; WATANABE, IS.; LOPES, RA.; PICOLI, F.** 2003. Effect of cadmium on the floor of the mouth on rats during lactation. *Braz. Oral. Res.* 18:105-9.

- **PROZIALECK, W.; EDWARDS, J.; WOODS, J.** 2006. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.* 79: 1493-1506.

- PROZIALECK, W.; EDWARDS, J.; NEBERT, DW.; WOODS, J.; BARCHOWSKY, A.; ATCHISON, WD.** 2008. The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol. Sci.* 102: 207-18.
- **RAMÍREZ, A.** 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* Vol. 63, N° 1, pp.51- 64.
- **RIGLA, M.; PÉREZ, A.; DE LEIVA, A.** 2001. Disfunción endotelial, alteraciones de la coagulación e hiperhomocisteinemia en la diabetes mellitus. *Cardiovascular Risk Factors.* Vol. 10, N° 5, pp. 296-302.
- **ROBERT, R.; CHAGNEAU-DERRODE, C.; CARRETIER, M.; MAUCO, G.; SILVAIN, C.** 2005. Gender differences in vascular reactivity of aortas from rats with and without portal hypertension. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 890-4.
- **RODGERS, CT.** 1995. Practical aspects of milk collection in the rat. *Lab. Anim.* 29: 450-5.
- **RODRÍGUEZ, T.; BELLALIZ, E.; MARCANO, L.; VILLAMEDIANA, P.** 2005. Efecto de la exposición al cloruro de cadmio sobre la maduración in Vitro de ovocitos bovinos. *RC.* Vol.15, No.5, p.443-450.
- **ROMERO, E.; ANTEQUERA, R.; VASQUEZ, J.; QUIJADA, W.; ESTRADA, O.** 2002. Cambios Ontogénicos en la Reactividad Cardiovascular inducidos por los Esteroides Androgénicos. *AVFT.* Vol. 21, N° 1, pp.16-21.
- **RONCO, AM.; ARGUELLO, G.; MUÑOZ, L.; GRAS, N.; LLANOS, M.** 2005a. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals.* 18: 233-241.

- **RONCO, AM.; ARGUELLO, G.; SUAZO, M.; LLANOS, M.** 2005b. Increased levels of metelothionein in placenta of smokers. *Toxicology*. 208: 133-139.

- **RONCO, AM.; GARRIDO, F.; LLANOS, M.** 2006. Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology*. 223: 46-53.

- **RUEF, J.; MÁRZ, W.; WINKELMANN, BR.** 2006. Markers for endothelial dysfunction, but not markers for oxidative stress correlate with classical risk factors and the severity of coronary artery disease. *Scand. Cardiovasc. J.* 40: 274-9.

- **SÁNCHEZ, PD.; VICENTE, C.; AREVALO, MA.; PEREZ, F.; LOPEZ, JM.; MORALES, AI.** 2006. Papel de la vía de Ras en un modelo de nefrotoxicidad inducida por cadmio. *Rev.Toxicol.* 23: 130-137.

- **SATARUG, S.; MOORE, MR.** 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health. Perspect.* 112:1099-103.

- **SATARUG, S.; NISHIJO, M.; LASKER, M.; EDWARDS, RJ.; MOORE, MR.** 2006. Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases? *Tohoku. J. Exp. Med.* 208:179-202.

- **SCHMIDT-LUCKE, C.; BELGORE, F.; REINHOLD, D.; ANSORGE, S.; KLEIN, H.; SCHMIDT-LUCKE, J.; LIP, G.** 2005. Soluble vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor Flt-1 and endothelial function in healthy smokers. *Int. J. Cardiol.* 100: 207- 212.

- **SCHUTTE, R.; NAWROT, TS.; RICHART, T.; THIJS, L.; VANDERSCHUEREN, D.; KUZNETSOVA, T.; VAN HECKE, E.; ROELS, HA.; STAESSEN, JA.** 2008. Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environ. Health. Perspect.* 116:777-83.

- **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. 1, N° 1, pp 7-17.

- **SUAREZ, F.; ZARANTE, I.; CÉSPEDES, C. 2005.** Development of endocrinological systemic diseases in the adult, the fetal programming hipótesis. Med. Clin. (Barc).124: 423-426.

- **TAUZIN, L.; RISSO, F.; BUFFAT, C.; SERRA, G.; SIMEONI, U. 2005.** Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease. Pediatr. Med. Chir. 27:18-23.

- **THOMPSON, J.; BANNIGAN, J. 2008.** Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. Reprod. Toxicol. 25: 304-15.

- **TZOTZES, V.; TZILALIS, V.; GIANNAKAKIS, S.; SARANTEAS, T.; PAPAS, A.; MOUROUZIS, I.; MOUROUZIS, C.; ZARROS, A.; PATOS, C.; COKKINOS, D.; CARAGEORGIU, H. 2007.** Effects of acute and chronic cadmium administration on the vascular reactivity of rat aorta. BioMetals. 20:83-91.

- **VAHTER, M; AKESSON, A; LIDÉN, C; CECCATELLI, S; BERGLUND, M. 2007.** Gender differences in the disposition and toxicity of metals. Environ. Res. 104: 85–95.

- **VASSALE, C.; BOTTO, N.; ANDREASSI, MG. 2003.** Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. Coron. Artery. Dis. 14:213-8.

- **WALKER, J.; HOUSEMAN, J.; SEDDON, L.; MCMULLEN, E.; TOFFLEMIRE, K.; MILLS, C.; CORRIVEAU, A.; WEBER, J.; LEBLANC, A.; WALKER, M.; DONALDSON, S.; OOSTDAM, J.** 2006. Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. *Environ. Res.* 100: 295-318.

- **WANG, L.; LEE, T.; LEE, F.; PAI, R.; CHAU, L.** 1998. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 152: 711–720.

- **WIER, P; MILLER, R.** 1987. The pharmacokinetics of cadmium in the dually perfused human placenta. *Trophoblast. Res.* 2: 357-366.

- **WINTOUR, E.; MORITZ, K.; JOHNSON, K.; RICARDO, S.; SAMUEL, C.; DODIC, M.** 2003. Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J. Physiol.* 549: 929-935.

- **WOODALL, S.; JOHNSTON, B.; BREIER, B.; GLUCKMAN, P.** 1996. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr. Res.* 40: 438-443.

- **WOODS, JM.; LEONE, M.; KLOSOWSKA, K.; LAMAR, PC.; SHAKNOVSKY, TJ.; PROZIALECK, WC.** 2008. Direct antiangiogenic actions of cadmium on human vascular endothelial cells. *Toxicol. In Vitro.* 22: 643-51.

- **YOON, YS.; UCHIDA, S.; MASUO, O.; CEJNA, M.; PARK, JS.; GWON, HC.; KIRCHMAIR, R.; BAHLMAN, F.; WALTER, D.; CURRY, C.; HANLEY, A.; ISNER, JM.; LOSORDO, DW.** 2005. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation.* 111: 2073-2085.

- **ZHANG, D.; LUMBERS, E.; SIMONETTA, G.; WU, J.; OWERS, J.; ROBINSON, J.; McMILLEN, I.** 2000. Effects of placental insufficiency on the ovine fetal renin-angiotensin system. *Exp. Physiol.* 85: 79-84.

- **ZIBARA, K.; CHIGNIER, E.; COVACHO, C.; POSTON, R.; CANARD, G.; HARDY, P.; MCGREGOR, J.** 2000. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2288-96.

ANEXO

ANEXO 1

Composición de la solución Krebs-Henseleit modificada (KHm), utilizada en la medición de la reactividad vascular

Solución (mM): NaCl 122; KCl 4,7; CaCl₂ x 2H₂O 2,0; MgCl₂ x 6 H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 15,5; EDTA 0,021 y Glucosa 11,5. La solución fue preparada en agua destilada y se ajustó su pH a 7,4 con HCl (10% v/v) o NaOH (0,1 N).

ANEXO 2

Protocolo del Análisis Inmuno-enzimático (EIA) comercial (Cayman Chemical) utilizado para la determinación de 8-isoprostano.

Tabla 12: Contenido del “Kit” EIA 8-isoprostano (Cayman Chemical catalogo N° 516351).

Numero	Artículo	Cantidad : 96 pozos
1	8-Isoprostano EIA antisuero	1 vial/ 100 dtn
2	8-Isoprostane AChE Trazador	1 vial/ 100 dtn
3	8-Isoprostane EIA Standard	1 vial
4	Buffer EIA Concentrado	2 viales/ 10 ml
5	Buffer de lavado Concentrado	1 vial/ 5 ml
5 ^a	Tween 20	1 vial/ 3 ml
6	Placa recubierta con IgG de ratón anti-conejo	1 placa
7	Cubierta de la placa	1 cubierta
8	Reactivo de Ellman`s	3 viales/ 100 dtn
14	Trazador EIA colorante	1 vial
15	Antisuero EIA colorante	1 vial

Tabla 13: Especificidad del “kit” EIA 8-isoprostano (Cayman Chemical catalogo N° 516351).

8-iso Prostaglandina F2 α	100%	2,3-dinor-6-keto Prostaglandina F1 α	0.09%
8-iso Prostaglandina F3 α	20,6 %	8-iso Prostaglandina F1 β	0.08%
2,3-dinor-8-iso Prostaglandina F2 α	4,00%	Tromboxano B2	0.08%
8-iso Prostaglandina E2	1,84%	11-dehydro Tromboxano B2	0.07%
2,3-dinor-8-iso Prostaglandina F1 α	1,7 %	11 β -Prostaglandina F2 α	0.03%
8-iso Prostaglandina E1	1,56%	Prostaglandina E2	0.02%
Prostaglandina F1 α	0,71%	8-iso-15(R)-Prostaglandina F2 α	0.02%
Prostaglandina F3 α	0.66%	8,12-epi iPF2 α -III	<0.01%
Prostaglandina E1	0.39%	iPF2 α -VI	<0.01%
Prostaglandina D2	0.16%	8,12-epi iPF2 α -VI	<0.01%
6-keto Prostaglandina F1 α	0.14%	tetranor-PGEM	<0.01%
Prostaglandina F2 α	0.14%	tetranor-PGFM	<0.01%

Purificación de las muestras

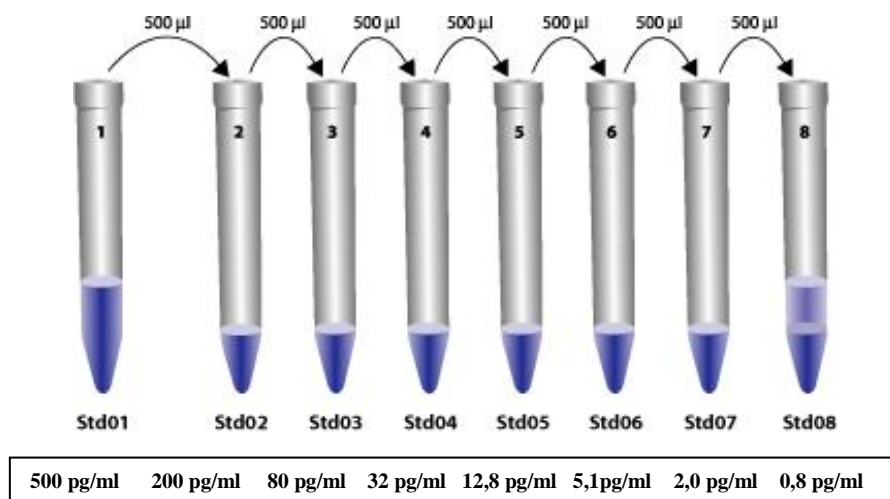
1. Los plasmas almacenados a -80°C , se descongelan en hielo. Luego se agrega 1 ml de muestra de plasma a un tubo de ensayo y 3 ml de buffer de columna, se agita y se centrifuga y se rescata el pellet.
2. En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se agrega 1ml de plasma y 50 μl de sorbente (absorbente), agitar y mezclar suavemente por 30- 60 minutos.
3. Centrifugar a 1500 g por 10 minutos para sedimentar. Remover y eliminar el sobrenadante suavemente con una pipeta para no tocar el sorbente (en él esta el 8-isoprostano), el sobrenadante carece de 8-isoprostano.
4. Lavar el sorbente una vez con 1 ml de agua ultra pura, mezclar y centrifugar 1500 g por 10 minutos y extraer nuevamente el sobrenadante.
5. Agregar 0,5 de solución de elusión (que lleva etanol), para resuspender el precipitado del sorbente y vortex.
6. Centrifugar a 1500 g por 10 minutos para sedimentar y retirar con cuidado el etanol. Repetir el lavado.
7. Evaporar a sequedad bajo nitrógeno. Es imprescindible que todos los solventes orgánicos sean eliminados, ya que pueden afectar negativamente a los resultados.
8. Luego las muestras se almacenan a -80°C , donde son estables durante al menos un año.
9. Antes de realizar el ensayo, las muestras que contiene 8-isoprostano se diluyen en un volumen de buffer EIA.

Preparación de la curva estándar 8-isoprostano:

Tomar un volumen pequeño de etanol con la punta de la pipeta y eliminarlo. Repetir este procedimiento 2 veces. Luego transferir 100 μl de 8-isoprostano estándar (vial # 3) en un tubo de ensayo limpio y diluir con 900 μl de agua ultra pura. La concentración de esta solución será de 5 ng / ml. Obtener 8 tubos de ensayo limpios y enumerar de # 1 a # 8. Agregar 900 μl de Buffer EIA al tubo # 1 y 750 μl de Buffer EIA a los tubos # 2- 8. Transferir 100 μl del estándar (5 ng / ml) a tubo # 1 y mezclar bien. La concentración de éste, que es el primer punto de la curva estándar será de 500 pg / ml. Luego diluir en serie

el estándar, se toman 500 µl del tubo # 1 y se agregan al tubo # 2 y se mezclan bien. Luego se toman 500 µl de tubo # 2 y se agregan al tubo # 3 y se mezcla bien. Este proceso se repite para los tubos # 4- 8. Estos estándares diluidos no se deben almacenar por más de 24 horas.

Figura 8: Esquema de las diluciones en serie de la curva estándar del EIA 8 - isoprostano.



Desarrollo del ensayo

La placa está formada por 96 pocillos y se realiza en duplicado. Se seleccionan 2 pocillos para el blanco (Blk), dos para NSB (unión no específica), dos pocillos para B0 (máxima unión), y dos pocillos para cada uno de los ocho puntos de la curva estándar. Las muestras se desarrollan en duplicado, se seleccionan dos pocillos para cada muestra (24 muestras). Se añade 100 µl Buffer EIA a los pocillos NSB y 50 µl a los pocillos de B0. Luego añadir 50 µl del tubo # 8 a dos pocillos, 50 µl del tubo # 7 a los próximos dos pocillos estándar. Se continúa con este procedimiento hasta que se agregan todos los volúmenes de los puntos de la curva estándar. Luego se agrega:

- 50 µl de cada una de las muestra por pocillo, como es en duplicado son dos pocillos por cada muestra.
- 50 µl de trazador a cada pocillo con excepción de TA (Total actividad) y del Blk.
- 50 µl de antisuero EIA a cada pocillo con excepción de TA, NSB y Blk.

Luego la placa se cubre con película de plástico y se incuba durante 18 horas a 4 ° C. Después de este tiempo de incubación se vacían los pocillos y se lava la placa cinco veces con el Buffer de lavado. Luego se agregan 200 µl del reactivo de Ellman`s a cada pocillo y 5µl de trazador a los pocillos de TA y se cubre la placa con la película plástica y se pone sobre un agitador orbital con cubierta plana para permitir que la placa se desarrolle en oscuridad. Este ensayo se desarrolla en 90-120 minutos. Transcurrido el tiempo, la placa se lee en un espectrofotómetro (ELX800) a una longitud de onda de 405 nm. La placa se lee cuando la absorbancia de B0 está en el rango de 0,3-1,0 U.A (restado el blanco).

Con las absorbancias obtenidas se calcula %B/B₀ el cual se extrapola en la curva de calibración y de este modo se obtiene la concentración de 8-isoprostano en pg/ml.

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

Definición de los términos clave

- **Blanco (Blk):** Es la absorbancia base, dada por el reactivo de Ellman`s. Este valor debe ser restado a las lecturas de absorbancias de todos los otros pocillos.
- **TA (Total Actividad):** Es la actividad enzimática total de la AChE unido al trazador.
- **NSB (unión no específica):** Es la unión no inmunológica del trazador a los pocillos.
- **B0 (máxima unión):** Máxima cantidad de trazador que el antisuero puede unir en la ausencia del analito libre.
- **%B/B0:** Es la razón entre la absorbancia de una muestra o estándar y la máxima unión de los pocillos.
- **Curva estándar:** es una curva entre %B/B0 *versus* los valores de concentración de una serie de pocillos que contienen cantidades conocidos variadas del analito.
- **Std0# (Estándar):** Estándar # 1 a # 8 realizados en serie diluyendo Std01 siete veces.
- **Muestras # (1#):** Las muestras y sus correspondientes factores de dilución (diluciones deberán estar inscritos en el formato indicado)
- **Sensibilidad:** 50% B/B0: 30 pg / ml; 80% B/B0: 5 pg / ml

ANEXO 3

Protocolo de la técnica de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) utilizado para determinar el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tabla 14: Especificidad del “kit” ELISA VEGF (R&D Systems). Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

Recombinante ratón:	Recombinante humano:	Otras proteínas recombinantes:	Recombinante de rata:		
PlGF-2	VEGF-B167	porcino PDGF	CINC-2 β	IL-1 α	Npn-2/Fc
VEGF-B167	VEGF-C	pez cebra VEGF	CINC-3	IL-1 β	PDGF-AA
VEGF115	VEGF-D		CNTF	IL-1ra	PDGF-AB
VEGF-B186	VEGF R3		CNTF sR α	IL-2	β -NGF
VEGF-D			E-selectin/Fc	IL-4	PDGF-BB
VEGF R2			IFN- γ	IL-6	CINC-2 α
VEGF R3			EphA5/Fc	IL-10	Npn-1/Fc
			EphB1/Fc	IL-18	MAC/Fc
			Fractalkine	TIMP-1	MIP-3 α
			GDNF	LIX	
			GM-CSF	TNF- α	

Contenido del “Kit” Inmunoensayo VEGF de Rata (R&D Systems)

Microplaca VEGF Rata: microplaca de poliestireno de 96 pocillos (12 tiras de 8 pozos) recubiertos con un anticuerpo monoclonal específico para VEGF ratas, conjugado VEGF rata, estándar VEGF rata, control VEGF (206-344 pg/ml), diluyente del ensayo, diluyente calibrador, reactivo color A y B y solución “stop”.

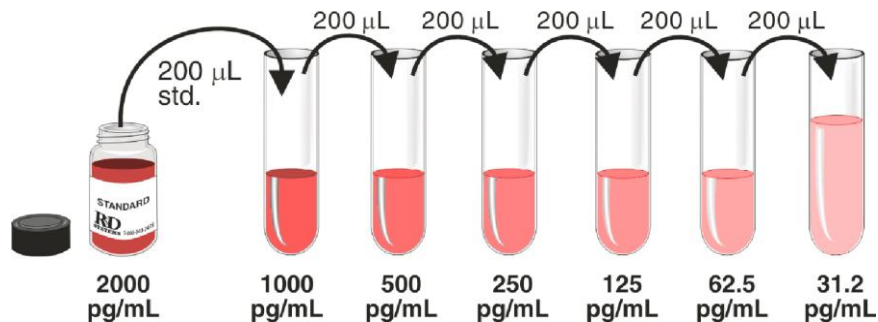
Preparación de las muestras y reactivos

Las muestras de suero almacenadas a -80°C se descongelan en hielo. Los reactivos se preparan según las indicaciones del “kit” y se dejan a temperatura ambiente antes de su uso.

Preparación de la curva estándar:

Se utilizan 6 tubos de polipropileno y se enumeran del # 1 a # 6. Se transfiere con una pipeta $200\ \mu\text{L}$ de diluyente calibrador a cada tubo. Luego se agrega $200\ \mu\text{L}$ del estándar ($2000\ \text{pg}/\text{ml}$) al tubo # 1 y se mezcla suavemente. La concentración de esta solución es de $1000\ \text{pg}/\text{ml}$. Luego se diluye en serie el estándar, se toman $200\ \mu\text{L}$ del tubo # 1 y se agregan al tubo # 2 y se mezcla bien. Luego se toman $200\ \mu\text{L}$ de tubo # 2 y se agregan al tubo # 3 y se mezcla bien. Este proceso se repite para los tubos # 4, 5 y 6. Así las concentraciones de la curva están en un rango de $31,2\ \text{pg}/\text{ml} - 2000\ \text{pg}/\text{ml}$.

Figura 9: Esquema de las diluciones en serie de la curva estándar del “kit” ELISA VEGF.



Desarrollo del ensayo:

Todas las muestras, el control, y la curva estándar se realizan en duplicado. La placa esta formada por 96 pocillos, se selecciona dos pocillos para el blanco, dos para el control, dos para cada uno de los siete puntos de la curva estándar y 2 pocillos para cada muestra (24 muestras).

Se agrega 50 μ l de diluyente del ensayo a cada pocillo. Luego se agrega 50 μ l del control a cada pocillo control, 50 μ l del estándar a cada pocillo estándar, 50 μ l del tubo #1 a los próximos dos pocillos, 50 μ l de tubo # 2 a los próximos dos pocillos estándar. Se continúa con este procedimiento hasta que agregan todos los volúmenes de los puntos de la curva estándar. Finalmente se agregan las muestras a los pocillos restantes, 50 μ l de cada una de las muestras por pocillo. Luego la placa se cubre con la cinta adhesiva y se incuba por 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador orbital con cubierta plana para permitir que la placa se desarrolle en oscuridad. Luego con una pipeta se aspira cada pocillo para eliminar el líquido y se lava la placa agregando a cada pocillo 200 μ l de buffer de lavado que después se aspira y se elimina. Este proceso de lavado se repite cuatro veces para un total de cinco lavados. Después del último lavado, se elimina cualquier resto de tampón de lavado por aspiración o decantación, se invierte la placa sobre una toalla de papel. Después se agrega 100 μ l del Conjugado VEGF de rata a cada pocillo, se cubre con una nueva tira adhesiva y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador. Se repite la aspiración y los lavados con el buffer de lavado. Luego se agrega 100 μ l de la Solución Sustrato (Reactivos A y B mezclados) a cada pocillo. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre la mesas, sin agitar y protegido de la luz. Se agrega 100 μ l de la solución “Stop” a cada pocillo y se homogeniza suavemente la placa. Posteriormente se determina la densidad óptica de la placa dentro de 30 minutos, utilizando un espectrofotómetro (ELX800) a una longitud de onda de 450 y 570 nm. Con las absorbancias obtenidas a 450 nm se le resta la lectura a 570 nm para corregir las imperfecciones de la placa (lecturas hechas directamente a 450 nm sin corrección puede ser imprecisas). A cada valor corregido se le resta el blanco y se saca promedio de los duplicados, para cada estándar, control y muestra. Con los valores de los puntos de la curva estándar se confecciona la curva y los valores de las muestras se extrapolan en la curva estándar y de este modo se obtiene la concentración de VEGF en pg/ml.

ANEXO 4

Protocolo de la técnica Real Time RT-PCR utilizada para la determinación y cuantificación del mRNA del gen de la enzima HEM oxigenasa tipo 1 (HO-1) y de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1):

1. Extracción de RNA

1. Se limpia el mesón de trabajo con cloroformo y se trata todo el material a usar con RNasa free (libre de RNAsas).
2. Las aortas almacenadas a -80°C , se sacan en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen y se degrade el RNA. El trozo de aorta se traspasa a un tubo de 2 ml limpio (libre de RNAsas) y se agrega 500 μl de “TRI Reagent” (trizol) y se homogeniza usando un homogenizador mecánico Polytron.
3. Centrifugar a 12000 g por 10 min. a 4°C y se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio.
4. Se agrega 200 μl de cloroformo libre de RNasa, se homogeniza manualmente y se mezcla con vortex por 15 segundos y se incuba a temperatura ambiente por 10 min.
5. Centrifugar a 12000 g por 15 min. a 4°C . Se generan 3 fases: superior acuosa (RNA), interfase (DNA) e inferior fenólica (proteínas). Traspasar la fase superior (200 μl) a un tubo limpio y agregar 300 μl de isopropanol libre de RNAsas, se homogeniza manualmente y se mezcla con vortex por 10 segundos y luego incubar a -20°C por toda la noche.
6. Centrifugar a 12000 g por 8 min. a 4°C (RNA precipita) y eliminar sobrenadante.
7. Lavar con 1 ml de etanol al 75% libre de RNAsas y vortex.
8. Centrifugar a 7500 g por 5 min. a 4°C . Eliminar el etanol y secar el pellet a temperatura ambiente hasta que esté cristalino (evitar que se reseque el pellet).
9. Agregar 25 μl agua dietilpirocarbonato (DEPC) y mezclar con vortex por 40 seg. Incubar a 37°C por 30 min. para hidratar el pellet (Figura 10). Cuantificar el RNA y almacenar a -80°C .

Figura 10: Pellet de RNA



2. Determinación de la concentración del RNA

1. Tomar 1 μl del RNA total y hacer una dilución 1:100 en agua DEPC (99 μl). Agitar en vortex por unos segundos.
2. Prender el espectrofotómetro y calibrar con 100 μl de agua DEPC. Desechar el agua y colocar 100 μl de la muestra en la celda de cuarzo y leer absorbancia a 260 nm. Registrar los datos y repetir el procedimiento para cada una de las muestras.
4. Calcular la concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\text{ml}$.) utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA total}] = (A_{260}) \times (40) \times 100 \text{ (Factor de Dilución)}$$
$$\text{RNA} = \mu\text{g}/\text{ml}.$$

3. Electroforesis de RNA

Luego se corrobora la integridad de éste mediante electroforesis en geles de agarosa/formaldehído al 1,2 % cargando 1 μg de muestra por carril.

***Preparación de un gel de 60 mL:**

Pesar 0,72 g de agarosa y se diluye en 45 mL de agua DEPC y se disuelve en microondas. Se enfria a 60° C y se agrega 9 ml de formaldehído 37% y 6 mL de buffer MOPS 10X (3-(N- morfolino) ácido propanesulfónico).

***Preparación de la muestra:** En un tubo libre de nucleasas agregar:

- 6 μl de agua DEPC
- 9 μl de Formamida
- 3 μl de formaldehído 37%
- 2 μl de MOPS 10X
- 0,5 μl de Bromuro de Etidio 10%
- 4 μl de muestra (1 μg)

Se denatura la muestra a 70° C por 10 min. Luego se agrega 3µl de Buffer de carga (Ambion) y se agita en vortex suavemente. El estándar de peso molecular se prepara igual que las muestras a partir de 2 µl del tubo original. Se carga el gel con las muestras y el estándar y se fracciona el RNA por 40 minutos a 80 volts. Se observa el gel en el transiluminador, y se registra la imagen.

4. Tratamiento del RNA con DNAsa antes del RT-PCR

El RNA que se extrae se trata con DNAsa RQ1 libre de RNAsas (Promega), con el fin de asegurar la ausencia de contaminación con DNA en la preparación. Se toma un volumen de la solución de RNA, de integridad comprobada, con aproximadamente 2 µg de RNA. A este volumen se añade 1 µl del tampón de reacción de DNAsa 10X RQ1 libres de RNasa, 2 µl RQ1 DNasa libres de RNasa y agua libre de nucleasa para completar un volumen final de 10 µl. Se incuba en un baño a 37° C por 30 minutos. Posteriormente, se detiene la reacción mediante la adición de 1 µl de solución “stop” RQ1 DNasa. Luego se incuba a 65 ° C por 10 minutos para inactivar la DNasa. Finalmente se almacena a –80° C.

5. Síntesis del DNA complementario (Transcripción reversa)

Un DNA complementario (cDNA) se sintetiza *in vitro* a partir de mRNA o de RNA total utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT) que utiliza como partidor un oligo-desoxitimidinas (oligo-dT). El cDNA obtenido corresponde a la totalidad de la población de RNA presente al inicio de la síntesis.

En un tubo Eppendorf de 0,6 ml libre de nucleasas, se agrega 1 µg de RNA tratado con DNasa, 1 µl oligo dT (partidor) y agua libre de RNasa necesaria para completar un volumen de 15 µl. Se incuba a 70° C por 5 minutos (termociclador) y luego se coloca en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se agrega a cada tubo los siguientes reactivos: 2,5 µl agua libre de RNasa, 5 µl de tampón 5X de la enzima, 1,5 µl dNTPs 10 mM y 1µl enzima transcriptasa reversa M-MLV. La mezcla (25 µl totales) se incuba a 42° C por 90 minutos y luego a 70° C por 15 minutos para desactivar la enzima. Luego se determina la concentración de cDNA sintetizado mediante un espectrofotómetro y se almacena a –20° C.

Así entonces se obtiene la primera hebra del cDNA, el cual se utiliza para una reacción de PCR en tiempo real usando partidores específicos para cada copia del gen.

6. Amplificación y cuantificación del cDNA (PCR en tiempo real)

El PCR a tiempo real se lleva a cabo mediante el aparato *LightCycle* 1,5 (Roche), y se utiliza el kit Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche. El *LightCycle* emplea capilares que son más eficientes en la transferencia térmica, así los ciclos son más cortos.

Figura 11. Equipo *Lightcycler* de Roche



Protocolo PCR en tiempo real

La mezcla de reacción (11,5 μ l) se prepara de la siguiente forma: se agrega en cada capilar de *LightCycle*: 6,5 μ l agua, 1 μ l (2,5 mM) $MgCl_2$, 1 μ l de la mezcla "Fast Start" DNA Master SYBR Green I de Roche la cual contiene dNTPs, la polimerasa "Fast Start" y el fluorocromo SYBR Green I, 0,5 μ l (0,25 mM) de partidore sentido, 0,5 μ l (0,25 mM) de partidore antisentido de los genes de β -actina, HO-1 y VCAM-1 en estudio y 1 μ l de cDNA. Luego los capilares se centrifugan a 3.000 rpm por 20 seg. y se colocan en el rotor del *LightCycle*. Luego se programa el *LightCycler*® de acuerdo al siguiente programa:

- **Pre-incubación** a 94 ° C durante 5 min.
- **Desnaturalización** (*Melting*, separación del DNA), 45 ciclos de 5 seg a 94° C
- **Hibridación** (*Annealing*, partidore se une al DNA) 8 seg. a 62° C
- **Elongación** (se genera la cadena de ADN por acción de la polimerasa) 20 s a 72° C.

Finalmente se desarrolla el análisis de la curva de fusión de los productos del PCR.

ANEXO 5



www.inta.cl
CASILLA 138 - 11
SANTIAGO - CHILE
FAX: (562) - 221 - 4030
TELEFONOS: 978 1400 - 978 1405
978 1407 - 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 N° 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